



ANNEE 2005

THESE : 2005 – TOU 3 – 4083

LE CONCEPT DE BIOSÉCURITÉ EN PISCICULTURE MARINE : PRÉVENTION DE L'ENCÉPHALITE VIRALE CHEZ L'OMBRINE SUBTROPICALE (*Sciaenops ocellatus*) EN MARTINIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Fabrice ADEE

Né, le 20 novembre 1979 à FORT-DE-FRANCE (Martinique)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Frédérique MESSUD-PETIT

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme Frédérique MESSUD-PETIT
M. Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Gilles BREUIL

Docteur Vétérinaire à l'IFREMER de PALAVAS-LES-FLOTS

Toulouse, 2005

NOM : ADEE

PRENOM : FABRICE

TITRE : LE CONCEPT DE BIOSECURITE EN PISCICULTURE MARINE : PREVENTION DE L'ENCEPHALITE VIRALE CHEZ L'OMBRINE SUBTROPICALE (*Sciaenops ocellatus*) EN MARTINIQUE.

RESUME :

En 1985, l'ombrine subtropicale (*Sciaenops ocellatus*) est introduite en Martinique, pour donner suite à l'aquaculture marine du bar. Il a été découvert que les géniteurs de la station IFREMER du Robert présentaient des anticorps spécifiques d'un betanodavirus responsable de l'encéphalite virale, maladie en pleine expansion dans le milieu aquacole marin mondial. Une démarche de biosécurité a donc été initiée afin de sélectionner des reproducteurs séronégatifs et de produire des larves indemnes de nodavirus. Ce concept basé sur un suivi sérologique des poissons par ELISA Ac a permis de diminuer la séroprévalence du cheptel. Une étude sérologique complémentaire a révélé une faible contamination par le nodavirus des alevins indemnes placés en cages d'élevage chez différents producteurs.

MOTS CLES : nodavirus, encéphalite virale, sérologie, ombrine subtropicale, épidémiologie, aquaculture.

TITLE: BIOSECURITY CONCEPT IN PISCICULTURE : PREVENTION OF VIRAL NERVOUS NECROSIS IN THE RED DRUM (*Sciaenops ocellatus*) IN MARTINIQUE.

ABSTRACT :

In 1985, red drum (*Sciaenops ocellatus*) was introduced in Martinique in order to replace sea bass fish farming. Nodavirus antibodies were detected in the broodstock at the IFREMER station in Robert. Nodavirus is responsible for viral nervous necrosis, a disease that is spreading quickly in worldwide marine aquaculture. A biosecurity process was initiated at the Robert hatchery to select seronegative breeders and produce nodavirus free larvae. This process, based on a serological follow-up of fish antibodies by ELISA, allowed a reduction of the number of seropositive fish. A complementary serological study revealed a low incidence of nodavirus contamination in nodavirus free larvae placed in sea cages on different production sites.

KEYWORDS : nodavirus, viral nervous necrosis, serology, red drum, epidemiology, aquaculture.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELF
	M.	M. ECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MARENDI Marc, *Pathologie de la reproduction*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS

M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
N. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
M. LEON Olivier, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A notre président de thèse

Monsieur le Professeur Henri DABERNAT

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie - Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Madame le Docteur Frédérique MESSUD-PETIT

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Pathologie infectieuse

Pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour son aide précieuse à sa rédaction,

Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Pathologie infectieuse

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Toute notre gratitude

A

Monsieur le Docteur Vétérinaire Gilles BREUIL, membre invité

IFREMER Palavas-les-flots

Pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de pathologie de l'IFREMER Palavas-les-flots (MONTPELLIER),

Pour ses précieux conseils, son aide à la réalisation de cette étude

Pour avoir partagé ses connaissances ,

Qu'il trouve ici exprimés nos sincères remerciements et toute notre reconnaissance.

A Jean Claude DAO,
IFREMER du Robert (MARTINIQUE),
Pour m'avoir permis d'effectuer cette étude au sein de l'IFREMER MARTINIQUE.

A toute l'équipe de la station IFREMER du Robert,
Philippe, Viviane, Jean-Claude, Bruno, Charles, Alain,
Pour leur accueil, leur aide précieuse et leur amitié.

Aux producteurs,
Philippe, Pascal, Alex, Alexis et son équipe,
Pour m'avoir laissé intervenir au sein de leur élevage

A Matthieu, Joss, Gaëlle,
Pour tous les bons moments partagés.

A mes parents Lucien et Maryvonne,
Pour leur amour au quotidien, leur soutien constant dans tous mes choix
et en témoignage de toute mon affection.

A ma sœur Muriel
Une vraie « chabine dorée » au caractère lunatique

A ma famille

A Kinou et toute sa famille,
Qui m'ont accueilli parmi eux, pour leurs preuves de confiance et
tous ces instants chaleureux

A tous les amis du groupe de T.P.,
Ramzy, No, Justine, Thiphaine, Olive, Paulo, Nico, Matmat, Psy,
Fosti, Arnaud et Eric (la dream team)
Que de moments inoubliables passés et j'espère à venir

A tous mes amis de Martinique,
Kiki, Chichine, Stève, RG, Manue, Armelle, Julien et Aïshala, Maéva, Aurélie,
Pour tous les délires partagés

A Délia

Aux Rieupeyrousains,
Laurent, Jean, Karine, Sandrine, Françoise et leurs familles
Pour m'avoir fait goûter aux plaisirs de la vie aveyronnaise

SOMMAIRE

INTRODUCTION	10
PREMIERE PARTIE : L'AQUACULTURE EN MARTINIQUE	12
I – LE CONTEXTE GLOBAL ET SON EVOLUTION	12
1 - L'aquaculture mondiale	12
2 - Le contexte martiniquais	13
II – BASES BIOLOGIQUES ET ZOOTECHNIQUES DE L'ELEVAGE DE L'OMBRINE SUBTROPICALE EN MARTINIQUE	18
1 - L'ombrine : références zootechniques	18
a - Taxonomie et description	18
b - Atouts "aquacoles" de l'ombrine subtropicale	19
c - Biologie	19
d - Elevage de l'ombrine subtropicale	22
2 - Structure et organisation de la filière ombrine à la Martinique	22
a - Ecloseries	22
b - Producteurs	23
c - Le marché	24
d - Etat sanitaire du cheptel martiniquais	24
III – UNE CONTRAINTE PATHOLOGIQUE : L'ENCEPHALITE VIRALE	28
1 – Le nodavirus	28
a – Morphologie et composition chimique	28
b - Classification	28
c – Stabilité du virion	29
d - Réplication du nodavirus	30
2 – Symptômes et lésions	31
a - Symptomatologie	31
b - Lésions	31
c - Pathogénie	32
3 – Epidémiologie	33
a - Répartition	33
b - Facteurs prédisposants	34
c - Transmission	35
4 – Diagnostic	37
a – Diagnostic clinique et différentiel	37
b – Diagnostics de laboratoire	37
5 – Traitement et prévention	40

DEUXIEME PARTIE : MISE EN PLACE DU CONCEPT DE BIOSECURITE EN MARTINIQUE	42
I – MATERIEL ET METHODES	44
1 - Les installations de la station IFREMER Martinique.....	44
2 – Sérologie des géniteurs.....	44
a - Animaux	44
b - Prélèvements	45
b - Analyse ELISA Ac	46
3 – Contrôle des larves.....	49
a - Prélèvements	49
b - Analyse ELISA Ag	49
4 - Contrôle et validation du concept de biosécurité: étude épidémiologique chez les producteurs.....	50
a – Choix de la population.....	50
b - Réalisation des prélèvements	50
c – Analyses	51
II – RESULTATS.....	52
1 – Sélection des géniteurs	52
2 – Contrôle des larves	58
3 – Contrôle et validation du concept : estimation de la prévalence dans certains élevages.....	58
III – DISCUSSION.....	60
CONCLUSION.....	64
BIBLIOGRAPHIE	66

INTRODUCTION

L'aquaculture moderne, de même que les autres filières de productions animales, est soumise à de nombreuses contraintes. Les règles de protection de l'environnement et les interdictions d'utilisation de certains produits, comme la furazolidone (antibiotique) ou le vert de malachite, se généralisent. En terme de réglementation sanitaire, seules l'anémie infectieuse du saumon, la septicémie hémorragique virale et la nécrose hématopoïétique sont des maladies soumises à déclaration obligatoire. L'encéphalite virale, maladie émergente de la pisciculture marine, n'en fait pas partie. Aucune réglementation n'impose un plan de surveillance ou de lutte contre cette maladie. Cependant, une alternative pour la combattre est le concept de biosécurité permettant l'obtention, à partir de géniteurs indemnes, de larves « propres », garanties sans agent pathogène. La biosécurité se définit comme l'ensemble des systèmes mis en place visant à protéger un cheptel des risques infectieux. La concrétisation de ce concept passe par l'évaluation et la réduction des risques de contamination par l'agent pathogène. Les géniteurs à l'origine des larves doivent être indemnes de tout pathogène, et maintenus dans un système d'élevage isolé du milieu extérieur.

Le nodavirus, agent étiologique de l'encéphalite virale, est particulièrement pathogène pour les larves de poissons marins. Par conséquent, la biosécurité visant à limiter son incidence, s'applique préférentiellement en amont des élevages larvaires (écloseries) car c'est à ce niveau que les animaux sont les plus sensibles et que la multiplication virale est la plus importante. Suite à l'apparition de cas de nodavirose (à la Réunion), sur des ombrines en provenance de la Martinique, mettant en cause la responsabilité de la station IFREMER du Robert (Martinique), une démarche de biosécurité y a été initiée. Elle consiste en un dépistage et une sélection des géniteurs indemnes. Cette démarche est complétée par un suivi sérologique de larves indemnes placées dans certains élevages, qui permettra de dresser un état des lieux sur la présence du nodavirus en Martinique et d'évaluer l'efficacité des mesures prises, en élevage.

Nous envisagerons, dans une première partie, l'aquaculture en Martinique : après avoir replacé la production aquacole martiniquaise dans le contexte plus général de la production aquacole mondiale, nous aborderons les bases biologiques et zootechniques de l'élevage de l'ombrine avant de décrire l'encéphalite virale chez les poissons marins. Nous verrons ensuite la mise en place du concept de biosécurité en Martinique ; nous analyserons les données accumulées durant ces trois années de suivi et celles de l'enquête réalisée en élevage.

PREMIERE PARTIE : L'AQUACULTURE EN MARTINIQUE

I – LE CONTEXTE GLOBAL ET SON EVOLUTION

1 - L'aquaculture mondiale

La production mondiale des pêches de capture et de l'aquaculture représente aujourd'hui plus de 15% de la production des protéines animales. La consommation de produits marins est en constante augmentation depuis les années 70. Compte-tenu de la stagnation des captures de pêche depuis une dizaine d'années, l'aquaculture contribue de plus en plus aux productions, passant de 5,3% en 1970 à 32,2% en 2000. Elle correspond à une production totale mondiale de 45,5 millions sur les 141,8 millions de tonnes débarquées. Les différentes espèces produites par l'aquaculture : poissons, mollusques, crustacés et plantes aquatiques représentent respectivement 50,4 %, 23,5 %, 3,6% et 22,2% du volume de la production mondiale aquacole pour l'année 2000 (FAO, 2003).

Les poissons d'eau douce (carpes, tilapias, poissons chats, etc.) dominent la production de poissons d'aquaculture avec 10,8 millions de tonnes soit 85,8% de la production totale en 2000; les espèces marines (bars, daurades, mérous, turbots, etc.) et diadromes (saumons, chanos, anguilles) ne représentent respectivement que 4.4 % (1,01 millions de tonnes) et 9,7 % (2,26 millions de tonnes) (FAO, 2003).

La production de la pisciculture marine a pratiquement doublé entre 1995 et 2000 bien qu'elle soit minoritaire par rapport aux autres secteurs aquacoles. Comparativement au marché mondial du saumon, les poissons marins comme le bar ou la dorade sont destinés à des marchés plus restreints (pourtour méditerranéen). L'aquaculture marine connaît un fort succès et s'adapte à l'évolution des goûts des consommateurs soucieux de diététique et à la recherche de produits nouveaux plus goûteux. La pisciculture marine permet aussi de produire des poissons prisés et à fortes valeurs comme le « barfin flounder » et le thon. Ces espèces sont très bien valorisées sur des marchés porteurs comme le Japon.

Selon une étude réalisée par l'OFIMER (Office National Interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture) pour le CFCE (Centre Français du Commerce Extérieur) sur le marché des produits traiteurs de la mer en Europe, la grande distribution joue un rôle de plus en plus important dans le commerce de détail des produits de la mer et de

l'aquaculture, mais la restauration hors foyer et commerciale semble également y participer. La consommation de ces produits évolue avec une progression des ventes de surgelés (surtout filets et produits élaborés) sur les dix dernières années. On assiste à un transfert de la consommation vers certaines espèces d'aquaculture (saumons, daurades, bar...) aux dépens d'autres poissons (cabillauds, harengs). L'élevage des poissons chats (genre *Pangasius*), des cobia (*Rachycentron canadum*) ou des ombrines subtropicales (*Sciaenops ocellatus*) se développe compte tenu de leur vitesse de croissance relativement rapide, des avantages économiques liés aux frais d'élevages moins importants et aux retours sur investissements rapides. Une ombrine subtropicale et un cobia atteignent respectivement les poids de 1 kg et 4 à 15 kg en un an, il s'agit donc d'espèces éligibles aux marchés des produits de transformation.

2 - Le contexte martiniquais

La pêche dans les Caraïbes se concentre essentiellement sur les espèces proches du littoral: lambis, langoustes, mérours, vivaneaux, ainsi que d'autres espèces liées aux récifs coralliens. L'exploitation des ressources pélagiques n'en est qu'à ses débuts, en raison principalement du manque de navires de pêche adaptés. Ainsi, comme la plupart des îles caribéennes, la Martinique souffre de sa petite taille et de ressources limitées à exploiter. Le poisson constitue un élément traditionnel et essentiel de l'alimentation martiniquaise. Les populations de la Caraïbe sont considérées comme d'importants consommateurs en terme de kg de poisson / habitant ; en 1991 à la Martinique 22 kg de poissons frais ont été consommés par habitant. A titre indicatif, l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) estime la consommation moyenne métropolitaine de produits de la mer (poissons, crustacés, coquillages), en 1990, à environ 14 kg par habitant.

Face à une production locale insuffisante au regard des besoins, les importations de produits aquacoles couvrent 45 % de la consommation totale de la Caraïbe en produit de la mer. En Martinique, elles s'élèvent à 7 413 tonnes en 2001 soit l'équivalent de 65 % de la consommation totale en produits marins (Gauthier, 2003).

La région Caraïbe bénéficie pourtant d'un énorme potentiel pour le développement de l'aquaculture : l'existence de sites appropriés, de températures permettant des croissances élevées, d'eaux de bonne qualité et de marchés demandeurs. Mais, contrairement au développement important de ce secteur à l'échelle planétaire, elle a peu développé son

aquaculture qui représente moins de 5 % des tonnages halieutiques produits dans la région Caraïbe.

Plusieurs raisons permettent d'expliquer cet état de fait:

- le manque de connaissances sur la biologie et le potentiel aquacole des espèces indigènes,
- le nombre limité de moyens et de structures de recherches (universitaires ou autres) et l'absence de moyens pour la mise en place de véritables programmes de développement,
- des investissements "prématurés" sur des projets mal maîtrisés se sont soldés par une série d'échecs retentissants qui ont doté l'aquaculture d'une mauvaise image de marque auprès des investisseurs potentiels et des financeurs publics ou privés.

La définition d'objectifs réalistes en terme de marché et de production, un soutien accru en matière de recherche/développement, la prise en compte des contraintes environnementales et sociales, sont des éléments à considérer pour développer une aquaculture rentable et durable.

L'aquaculture d'eau douce et marine se sont toutes deux développées en Martinique à une petite échelle (tableau 1).

Tableau 1 : Evolution de la production aquacole martiniquaise (en tonnes) de 1982 à 2002.

année	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Chevrettes (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	6	13	27	35	50	53	52	57	49	52	38	42	40	40	35	44	25	20	19	19	19
Tilapia ou "Saint Pierre" (<i>Oreochromis mossambicus</i>)						1	1	14	26	25	25	25	40	18	10	10	10	10	8	8	8
Ombrine ou loup des caraïbes (<i>Sciaenops ocellatus</i>)						1	0.5	3	2	10	15	10	12	7	10	12	20	30	24	24	24
Total des productions	6	13	27	35	50	55	53.5	74	77	87	78	77	92	65	55	66	55	60	51	51	51

La chevrette (*Macrobrachium rosenbergii*) et le tilapia ou « Saint Pierre » (*Oreochromis mossambicus*) sont les deux espèces choisies pour l'aquaculture en eau douce aux débuts des années 80. Les premiers résultats pleins de promesses se sont traduits par une forte croissance des superficies exploitées, des tonnages produits et des performances. Puis des problèmes en amont et en aval de la filière engendrèrent une baisse de la production

(tableau 1). Les problèmes identifiés sont : des difficultés de production de juvéniles, l'apparition de maladies, une productivité trop faible en bassins, une mauvaise qualité des aliments produits sur place, mais aussi des problèmes liés à la qualité de l'eau et enfin les importations croissantes de chevrettes congelées en provenance d'Asie et à des prix très concurrentiels. Ces différents éléments ont entravé l'essor de l'aquaculture d'eau douce qui actuellement, avec ses 27 tonnes de production par an contre 65 tonnes en 1990, tente de subsister.

L'ombrine, appelée localement « loup des caraïbes » est actuellement la seule espèce d'aquaculture marine, elle succède au bar dont l'élevage débuta en 1981 et disparut quelques années plus tard à cause de l'encéphalite virale. Le marché de l'ombrine se met progressivement en place en Martinique. Sa production est mineure comparativement aux autres pays (tableau 2). Parallèlement, à Mayotte, une exploitation semi-industrielle se développe afin de fournir un marché d'exportation vers la métropole, les prévisions laissent envisager pour l'année 2005 une production de 280 tonnes. En 2003, l'élevage de l'ombrine s'est arrêté en Israël à cause de contraintes environnementales liées au tourisme. En Equateur, c'est le manque de marché qui engendra l'arrêt de la production. En Chine, dix millions de larves ont été mises en élevage en 1999, ce qui équivaldrait à une production de 20 000 tonnes d'ombrines subtropicales. L'essentiel de cette production s'écoule sur le marché local (Hong et Zhang, 2003). Compte-tenu de l'absence de données sur les tonnages produits dans les pays asiatiques (Corée, Chine, Taiwan), il est difficile d'établir précisément la production mondiale d'ombrines subtropicales.

Tableau 2 : Volume de production d'ombrines subtropicales dans quelques pays (données non exhaustives)

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Equateur			2372	1894	1894	1894			
Israël	104	128	101	197	109	140	438		
Martinique	12	20	30	24	24	24	50	100	80
Réunion					15	*	40	40	80
Mayotte					*	*	200	220	280

* donnée manquante

Photo 1 : Ombrine Subtropicale – *Sciaenops ocellatus* (Géniteur de la station IFREMER du Robert)
(source :IFREMER Robert)



Figure 1 : Aire de répartition naturelle de l'ombrine subtropicale



II – BASES BIOLOGIQUES ET ZOOTECHNIQUES DE L'ELEVAGE DE L'OMBRINE SUBTROPICALE EN MARTINIQUE

1 - L'ombrine : références zootechniques

a - Taxonomie et description

Sa classification taxonomique est la suivante :

Embranchement: Vertébrés

Classe: Osteichthyens

Ordre: Perciformes

Sous Ordre: Téléostéens

Famille: Sciaenidae

Espèce: *Sciaenops*

Genre: *ocellatus*

Nom vernaculaire américain: Red drum ou Red fish

Nom vernaculaire français: courbine ou tambour rouge

Nom commercial martiniquais: Loup des caraïbes

La famille des Sciaenides est appelée usuellement en anglais « drums », littéralement tambours. Elle comprend aussi des poissons vivants dans les eaux françaises comme le maigre (*Argyrosomus regius*), l'ombrine bonze (*Umbrina canariensis*) et l'ombrine côtière (*Umbrina cirrosa*) dans le golfe de Gascogne. Ces poissons, y compris l'ombrine, ont la particularité de produire un son audible par vibration de leur vessie natatoire au moment de la reproduction. Ce son bref, grave et fort, se rapproche du battement de grosse caisse d'où leur nom de « tambours ».

L'ombrine subtropicale est un poisson de grande taille, les plus grands spécimens peuvent atteindre 155cm et 45 kg, ceux de 100 cm sont fréquents.

Son corps est allongé et légèrement aplati latéralement. Le dos est arrondi et le profil ventral presque droit. La bouche, horizontale, est en position inférieure avec des dents implantées en bandes sur les deux mâchoires. La nageoire dorsale est bipartite, sa partie antérieure comporte 10 rayons mous. Chez l'adulte, la nageoire caudale est légèrement concave. Sa couleur est gris

argenté nuancé de cuivre ou de bronze. La queue prend parfois une coloration bleutée. L'espèce se caractérise par la présence d'une ou plusieurs taches noires (ocelles), sur la partie dorsale de la zone postérieure de l'animal jusqu'à la base de la caudale. Le corps est recouvert de grandes écailles (photo 1). La ligne latérale est très visible (Houel, 1996)

b - Atouts "aquacoles" de l'ombrine subtropicale

Suite à l'arrêt de l'élevage du bar à la fin des années 80, l'ADAM (Association de Développement de l'Aquaculture Martiniquaise) décide d'importer et de développer celui d'une nouvelle espèce : l'ombrine subtropicale. Son nom anglais « Red drum » laissant supposer qu'il s'agissait d'un poisson de couleur rouge, prisé aux Antilles, incita son implantation sur l'île. Mais sa véritable coloration grise argentée ne découragea pas cette initiative, compte-tenu de ses qualités biologiques. En effet, cette espèce à croissance relativement rapide atteint une taille commercialisable (1 kg) en moins d'un an, de plus son acclimatation aux conditions locales et d'élevage est parfaite et témoigne de sa robustesse. La maîtrise de sa reproduction en Martinique a été facilitée par les connaissances américaines acquises en lien avec le repeuplement du milieu sauvage. Toutes ces raisons ont concouru au choix de cette espèce à forte « potentialité aquacole » pour le développement du secteur piscicole martiniquais.

c - Biologie

L'aire de répartition naturelle de l'ombrine, s'étend de l'ouest du golfe du Mexique (lagune Madre) à la pointe de la Floride, et sur la côte Atlantique, du sud de la Floride à New York (figure 1). Les larves et les juvéniles se trouvent à proximité des estuaires tandis que les adultes se situent dans les eaux côtières et vivent sur les fonds sablonneux ou vaseux (démersaux).

Il s'agit d'un poisson eurytherme qui supporte une large gamme de température allant de 2°C à plus de 30°C ; par contre il tolère mal les brusques variations thermiques. L'adulte euryhalin, supporte des variations importantes de salinité allant de 1 à 40 ‰. Cependant, les œufs requièrent une salinité proche de 25 ‰ pour leur développement. (Neill, 1987).

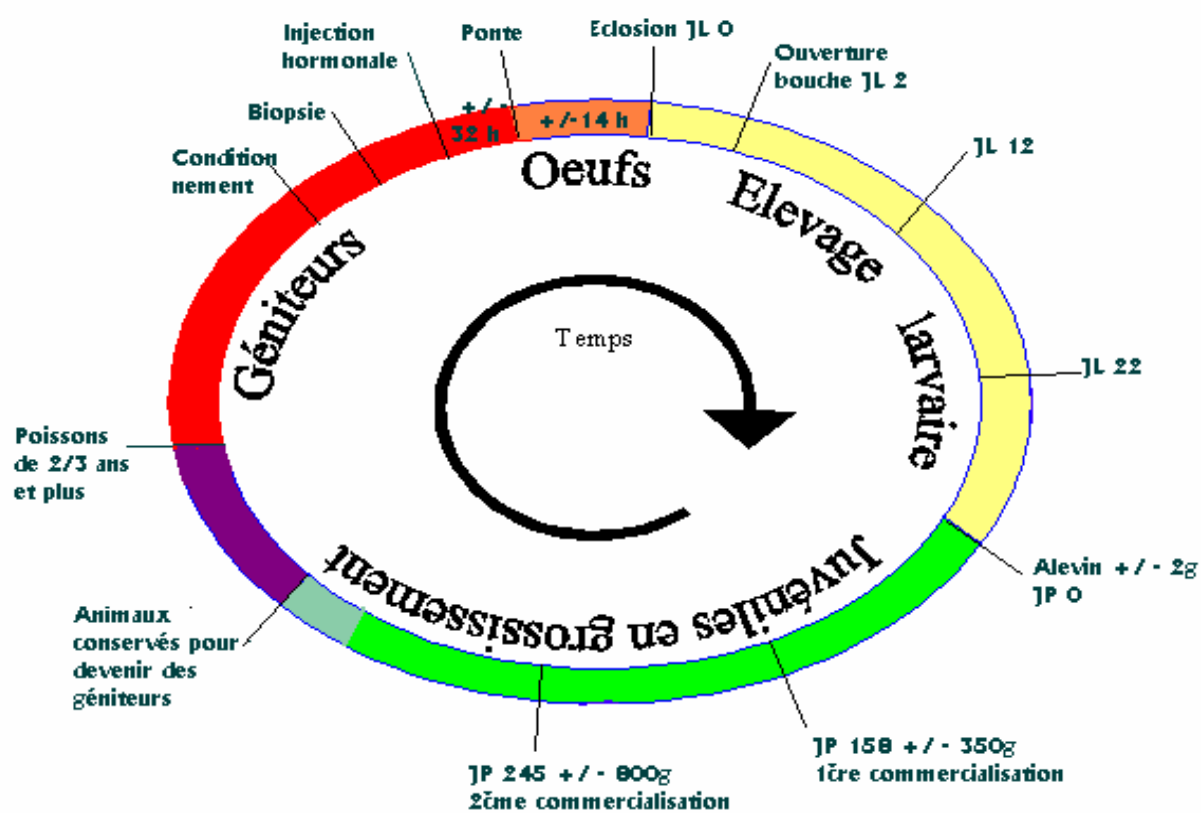
L'ombrine subtropicale est un poisson carnivore. Son régime alimentaire varie en fonction de sa taille. Quatre jours après la ponte, les larves commencent à se nourrir. Les œufs

d'autres poissons et le zooplancton (copépodes cyclopoidés et calanidés, mysidacés) constituent l'essentiel de leur repas. Les juvéniles se nourrissent d'amphipodes, de crevettes pénéides, de crabes callinectides ainsi que d'autres poissons (*Mugil cephalus*, *Leiostomus xanthurus*, *Lagodon rhomboides*, *Orthopristis chrysoptera*). Les proies de l'ombrine en milieu naturel sont, par ordre d'importance décroissante: les crustacés (crabes et crevettes pénéides), les poissons, et les polychètes (Matlock, 1987 ; Houel, 1996).

Les travaux d'Overstreet (1983), Beckman (1988), Fitzhugh (1988), Murphy et Taylor (1990), réalisés sur des populations sauvages d'ombrines subtropicales, ont permis d'établir que la maturité sexuelle apparaît entre 1 et 3 ans pour les mâles (plus de 50% à 2 ans ; 100% à 3 ans) et entre 3 et 6 ans pour les femelles (50% à 4 ans ; 100% à 6 ans). Ces travaux ont aussi mis en évidence un gradient de précocité de la première maturation sexuelle du Nord vers le Sud, ce que semblerait vérifier la précocité des ombrines placées dans les conditions naturelles martiniquaises. En Martinique, la maturation sexuelle des ombrines commence au mois de juillet. Il s'agit d'une période d'accroissement de la température, constante mais de faible amplitude et de décroissance de la durée du jour (de 13 h à 12 h). Les pontes commencent à la fin du mois d'octobre et se poursuivent jusqu'au mois de décembre (Gardes, 1998).

Dans les eaux subtropicales Nord américaines, les pontes se produisent à la fin de l'été, à proximité des passes et des canaux. Les œufs et larves pélagiques, durant les premiers jours, dérivent grâce aux courants à l'embouchure des estuaires. Les larves deviennent ensuite plus démersales et s'alimentent dans des zones plus profondes. Les juvéniles (8-10 jours), très euryhalins, se nourrissent principalement de microbenthos (petits organismes des fonds marins de taille inférieure à 0.063 mm). Ils séjournent dans les estuaires jusqu'à l'âge de leur première maturité sexuelle, aux alentours de 4 ans.

Figure 2 : Schéma du cycle de production de l'ombrine (source : ifremer)



d - Elevage de l'ombrine subtropicale

La reproduction des ombrines peut être obtenue de deux manières différentes. La simulation des variations naturelles de la photopériode dans des salles de conditionnement permet d'obtenir la maturation des géniteurs. La ponte des femelles est obtenue suite à un cycle photopériodique de 120 jours et dure 2 mois et demi à trois mois (figure 2). Durant le cycle de conditionnement, le suivi de la maturation des géniteurs est établi par l'observation des biopsies des organes génitaux. Il permet de déterminer les femelles les plus aptes à l'induction hormonale. Cette dernière technique offre un contrôle plus précis de la date et de la synchronisation des pontes. Par ailleurs, les croisements des géniteurs sont mieux maîtrisés grâce à ce procédé. L'induction consiste en une administration d'hormone gonadolibérine : la LH-RH (Luteinising Hormon Releasing Hormon). La dose hormonale est administrée par injection intramusculaire, entre les deux filets, derrière la 2^e nageoire dorsale, au niveau de la région caudale. Suite à l'induction, la femelle est placée dans un autre bac en compagnie du mâle choisi pour la fécondation. La ponte aura lieu $28 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ après l'injection. Les œufs fécondés flottent et sont récupérés par surverse dans un collecteur puis placés dans d'autres bacs pour la croissance larvaire (Gardes, 1998 ; Goyard et al, 1993). L'élevage larvaire constitue la phase la plus délicate du cycle puisque qu'elle nécessite l'élevage en parallèle de proies vivantes (rotifères et artémias), pour l'alimentation des larves, ainsi que de nombreuses opérations de tris destinées à limiter le cannibalisme inhérent à cette étape.

Les juvéniles sont ensuite placés en mer dans les cages d'élevage dotées de filets à mailles évoluant avec leur taille (5, 12, 20 mm). La production de poissons de 300g, 800g et 1 Kg est assurée respectivement en 5, 8 mois et un an. Les poissons sont nourris avec des aliments composés (granulés) importés mais spécialement conçus pour cette espèce.

2 - Structure et organisation de la filière ombrine à la Martinique

a - Ecloseries

Actuellement, la Martinique compte trois structures capables de produire des alevins et ayant leur propre stock de géniteurs : la station de l'IFREMER au Robert, l'ADAM (Association de développement de l'aquaculture Martiniquaise) et une petite entreprise privée AQUANORD.

Les géniteurs de la station IFREMER du Robert sont conditionnés en bassins et dans des cages en mer. Ces poissons ont été importés principalement des Etats-Unis entre 1987 et 1999 ; ils servent aux expérimentations et à l'obtention de pontes destinées aux expériences mais aussi à l'approvisionnement des aquaculteurs. Ils permettent à l'IFREMER de répondre aux missions principales de recherche et de soutien à la filière aquacole.

L'ADAM est une association subventionnée en partie par le conseil général. Son rôle initial se situe à l'interface entre la recherche et la production. Cette « station pilote » dispose d'un lot de géniteurs pour l'approvisionnement des fermes en alevins et ses propres expérimentations. Cette structure fonctionne aujourd'hui comme un organisme privé et n'approvisionne plus la filière pour des raisons inconnues.

AQUANORD est la seule éclosérie privée de l'île, elle détient quelques géniteurs dont les pontes sont uniquement destinées à son atelier de grossissement. Elle a maintenant pour objectif d'augmenter la production d'alevins afin de répondre à la demande croissante de la filière.

L'IFREMER, l'ADAM et AQUANORD possèdent donc leurs géniteurs mais aussi le matériel et le personnel qualifié afin de mener à bien des élevages larvaires. Très souvent les larves de 1 jour obtenues par l'IFREMER sont livrées aux autres écloséries qui se chargent de l'élevage larvaire. Pendant quelques années l'IFREMER a été seule à fournir les aquaculteurs. L'institut est maintenant engagé dans une phase de transfert de savoir-faire et tente de passer le relais à des structures privées comme AQUANORD. Cette transition passe pour l'instant par une collaboration et un échange de savoir-faire entre le personnel de l'IFREMER et celui d'AQUANORD.

b - Producteurs

L'élevage de l'ombrine compte en Martinique une douzaine d'entreprises artisanales. Chaque aquaculteur possède entre 1 et 7 cages pouvant contenir de 1 500 à 4 000 poissons en fonction du poids des animaux.

Les concessions obtenues auprès des affaires maritimes varient entre 1 500 et 5 500 m² en mer suivant les exploitations et de 20 à 700 m² à terre. Ces dernières leur permettent d'avoir de petits locaux pour le stockage du matériel et de l'alimentation. En général les aquaculteurs disposent aussi d'une petite embarcation afin d'effectuer l'entretien, les pêches, et le nourrissage des poissons. Les sites d'élevages se situent tant sur la côte Caraïbe où les eaux

plus profondes subissent un renouvellement important, que sur la côte Atlantique dans des baies fermées et bien protégées mais avec des fonds moins importants.

La production moyenne d'un aquaculteur est de 5 tonnes d'ombrines par an. Elle doit atteindre 9 à 10 tonnes afin de dégager un salaire suffisant pour une personne. Par conséquent les aquaculteurs ont souvent une seconde activité en parallèle. Les objectifs des aquaculteurs à court terme se situent généralement entre 15 et 20 tonnes. Actuellement la production est limitée par l'inexistence de réseaux et de structures de distribution organisés. Cependant, l'efficacité des dispositifs de concentration de poissons ou DCP (systèmes ancrés au large et destinés à rassembler les poissons) placés autour de l'île permet l'introduction de grosses pièces sur le marché local et incitera la mise en place d'un circuit de distribution et de structures de transformation nécessaires à la commercialisation des poissons de grande taille. L'ombrine pourrait ainsi bénéficier de cette structuration.

c - Le marché

En Martinique, les produits aquacoles souffrent de la mauvaise image des élevages intensifs comparativement à ceux de la pêche. Suite aux démarches de promotion l'ombrine conquiert progressivement une part du marché local. Les aquaculteurs privilégient la vente aux restaurateurs, comités d'entreprise, particuliers et marchés sous forme de poissons entiers (éviscérés et écaillés), en darnes ou filets. Pour des raisons économiques et l'absence de structures adéquates, ils se dispensent du stockage en chambre froide du poisson. Outre les activités d'élevage et de pêche du poisson, les aquaculteurs se chargent de la préparation (écaillage, éviscération, découpe éventuelle) et de la commercialisation de leurs produits. Pour le moment, toutes les procédures de préparation du poisson sont manuelles et effectuées par l'aquaculteur. La création d'ateliers de transformation (filetage, préparation de darnes...) et un meilleur approvisionnement en alevins permettraient d'agrandir le marché aux grandes et moyennes surfaces.

d - Etat sanitaire du cheptel martiniquais

Le manque de données exploitables dans les élevages (courbes de mortalité et de poids moyen) rend la réalisation d'un suivi sanitaire difficile. Les éleveurs se contentent d'une observation des poissons lors de la distribution d'aliments. Seuls les événements pathologiques aigus sont décelés.

Cependant, une évaluation de l'état sanitaire des élevages d'ombrines subtropicales fut établie par Cosnefroy en 2000, dans la station IFREMER et les élevages martiniquais. Cette étude succincte ne mentionne pas d'agent pathogène préoccupant. Elle signale par contre la présence dans tous les élevages (40 à 60 % des individus) d'un ectoparasite (*Neobenedia melleni*) témoin d'un déséquilibre dans l'élevage (stress, mauvaise alimentation ou problèmes pathologiques sous-jacents). De plus, les lésions provoquées par ce parasitisme peuvent être une voie de contamination pour un autre pathogène.

Dans ce secteur où la production est faible et le suivi sanitaire des élevages peu rigoureux, nous ne disposons que de peu d'éléments reflétant la situation sanitaire dans les élevages. Par ailleurs, la seule épizootie marquante de l'aquaculture marine martiniquaise reste celle de la nodaviruse apparue sur les élevages de bars en 1985.

Conclusion

Malgré les fortes potentialités de l'ombrine et les nombreux atouts présents à la Martinique pour l'aquaculture (température de l'eau élevée et relativement constante, nombreux sites, existence d'un marché, possibilité d'exportation), l'élevage de l'ombrine subtropicale reste une production artisanale destinée à un marché local. La filière souffre actuellement d'un manque de structuration pour la commercialisation des poissons produits. La création d'ateliers de conditionnement, voire de transformation, utiles à une diversification des produits proposés constituent deux éléments indispensables à l'essor de ce secteur. Cette organisation pourrait aussi profiter aux autres filières aquacoles existantes (tilapia et chevrettes). Aucun groupement n'existe à l'heure actuelle, et ne prend en charge l'achat du poisson aux producteurs, sa préparation et sa vente. Un maillon intermédiaire s'avérerait utile pour les éleveurs et nécessaire à une structuration logique de la filière.

Une telle organisation laisserait envisager de bonnes perspectives pour la production aquacole martiniquaise locale. Sa croissance pallierait une surexploitation des ressources halieutiques, élément préoccupant de l'île. Il serait aussi possible à terme de s'engager sur un marché d'exportation, à l'instar d'un élevage mahorais expédiant sa production vers la Métropole. Les coûts de production relativement modestes, liés à la vitesse de croissance de l'ombrine, permettent de compenser les frais d'expédition.

III – UNE CONTRAINTE PATHOLOGIQUE : L'ENCEPHALITE VIRALE

L'ombrine subtropicale est une espèce aquacole nouvelle ; les contraintes initiales ont été principalement d'ordre zootechnique (problèmes de cannibalisme en élevage larvaire). Les cas déclarés d'encéphalite virale en Israël et Corée du Sud (Oh et al, 2002; Ucko et al, 2004) témoignent de la sensibilité de l'espèce au nodavirus, agent responsable de cette maladie émergente du secteur aquacole marin.

1 – Le nodavirus

a – Morphologie et composition chimique

En 1988, Bellance et Gallet de Saint-Aurin rapportent des cas d'encéphalopathie virale en relation avec la présence de nombreux virions dans les tissus nerveux de bars élevés en Martinique. La microscopie électronique permet dans un premier temps d'étudier les caractéristiques morphologiques du virion et révèle sa petite taille, entre 25 et 30 nm de diamètre, son absence d'enveloppe et une capside à symétrie icosaédrique (Renault et al, 1991). Ultérieurement, les travaux scientifiques menés sur la purification et la caractérisation du nodavirus, à partir de carengues (*Pseudocaranx dentex*), de bars et de loups tropicaux (*Lates calcarifer*) précisent les connaissances : la capside est constituée d'une protéine d'approximativement 42 kDa, issue de la transcription de l'ARN 2 du génome viral (Mori et al, 1992 ; Comps et al, 1994). Ce dernier comporte deux simples brins d'ARN à polarité positive. Le premier de 3.1 kb code pour une protéine non structurale de 100 kDa : une ARN polymérase ARN dépendante ; le deuxième de 1.4 kb est à l'origine d'une protéine de capside pouvant se présenter sous deux formes légèrement différentes respectivement de 42 et 40 kDa.

b - Classification

Avec les données morphologiques initiales, le virus fut d'abord apparenté à la famille des Picornaviridae (Glazebrook, 1990 ; Breuil, 1991 ; OIE, 1995). Son introduction dans la famille des *Nodaviridae* date de 1992, grâce aux travaux de Mori. Deux genres composent actuellement cette famille :

- les alphanodavirus qui ne sont pathogènes que pour les insectes
- les bêtanodavirus, auquel appartient le virus de l'encéphalopathie virale, infectent principalement les poissons marins à l'état larvaire ou juvéniles.

Sept souches sont officiellement recensées (Munday et al, 2002 ; OIE, 2000) : barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), *Dicentrarchus labrax* encephalitis virus (DIEV), japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV), *Lates calcarifer* encephalitis virus (LcEV), redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV).

Une classification génomique a également été établie à partir de 25 souches isolées, suivant la séquence de nucléotides de l'ARN 2 codant pour la protéine de capsid. Elle distingue quatre génotypes correspondant à des ensembles de poissons proches morphologiquement. Les quatre groupes sont ceux des RGNNV, BFNNV, SJNNV, TPNNV (Nishizawa et al, 1997). Mori différencie à son tour trois sérotypes. Les sérotypes A et B correspondent respectivement aux génotypes SJNNV et TPNNV, tandis que le sérotype C regroupe les deux génotypes RGNNV et BFNNV (Mori et al, 2003).

c – Stabilité du virion

L'étude du virus révèle une grande résistance aux agents physiques (tableau 3). A des températures comprises entre - 80°C et 4°, il est stable durant un minimum de six mois ; il résiste plusieurs semaines aux températures ambiantes (14 - 24°C). Cette stabilité face aux traitements thermiques s'explique par sa petite taille et l'absence d'enveloppe.

De plus, il est détecté pendant plusieurs semaines dans l'eau de mer à des températures entre 4°C et 29°C. Une grande stabilité en eau douce et en milieu acide a été mise en évidence.

Les désinfectants les plus efficaces sont l'hypochlorite de sodium (javel) et l'iode, cependant la présence de matières organiques dégrade considérablement leur activité virucide. (Peducasse, 2000). Il semblerait que le virus soit sensible aux ultra violets puisque certains auteurs recommandent leur utilisation pour une désinfection de l'eau des élevages larvaires à une intensité de $1 \times 10^5 \mu\text{W} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. De même, l'ozone, à partir d'une concentration de $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, a révélé une activité significative lors du traitement d'eau contaminée par le nodavirus (Arimoto et al, 1996).

Tableau 3 : Résistance du nodavirus du bar aux facteurs physico-chimiques (Peducasse, 2000)

Exposition	Durée
Température de – 80°C sur milieu cellulaire	30 mois
Température de 24°C sur milieu cellulaire	3 mois
Température de 70°C sur milieu cellulaire	60 minutes
Température de 10 °C en eau de mer	4 mois
Température de 29°C en eau de mer	1 mois
pH = 2	3 mois
pH = 11	2 jours
Hypochlorite de sodium à 100 ppm*	5 minutes
Iode à 100 ppm*	5 minutes
Ammonium quaternaire (Cetavlon®) 5%*	5 minutes

*exposition réalisée sans sérum de veau fœtal

d - Réplication du nodavirus

Bien que la réplication des bêtanodavirus ait principalement lieu dans les cellules de poissons, les travaux de Delsert et al (1997) montrent que les lignées cellulaires de mammifères (COS1 et HeLa) sont réceptives au virus de l'encéphalite virale du bar (DIEV), mais la réplication est moins importante que dans les lignées cellulaires de poissons (SBL, RTG2 et BF2).

Le nodavirus est capable de se multiplier sur la lignée cellulaire SSN-1 dans une gamme de température allant de 14 à au moins 29°C. Le taux de réplication entre 20 et 29°C est supérieur à celui obtenu à température plus basse (14°C) (Peducasse, 2000). De même, la croissance d'une souche pathogène pour le mérou se fait entre 20 et 32°C, sur la lignée cellulaire GF-1 issue de la nageoire de mérou, et est maximale à 32°C (Chi et al, 1999). La réplication virale du nodavirus s'effectue suivant un cycle propre à certains virus à ARN (+). Le mécanisme de pénétration du virus dans la cellule cible n'a pas été élucidé. La traduction de l'ARN (+) est directe et aboutit, dans le cas de l'ARN 1, à l'obtention d'une ARN polymérase ARN dépendante utile à la synthèse du génome des futurs virions. La protéine codée par l'ARN 2 donne, après assemblage avec d'autres protéines, la capside virale dans laquelle seront incorporés les brins d'ARN positifs synthétisés. Un troisième ARN, de 0.4 kb, issu de la réplication de l'ARN 1 a été mis en évidence (Delsert et al, 1997) dans les cellules

infectées. Un cadre ouvert de lecture y a été identifié chez le flétan (*Hippoglossus hippoglossus*) et correspondrait à une protéine qui reste à mettre en évidence (Sommerset et Nerland, 2004).

2 – Symptômes et lésions

a - Symptomatologie

Les symptômes majeurs, communs à un grand nombre d'espèces et caractéristiques de la maladie sont des signes nerveux se traduisant par une perte de l'équilibre, une nage anormale en cercle ou en spirale accompagnée de contractions musculaires violentes (tournis), une hypersensibilité au bruit et à la lumière. L'anorexie, la coloration progressive du tégument ou décoloration suivant les espèces, l'hyper-inflation de la vessie natatoire peuvent être associées.

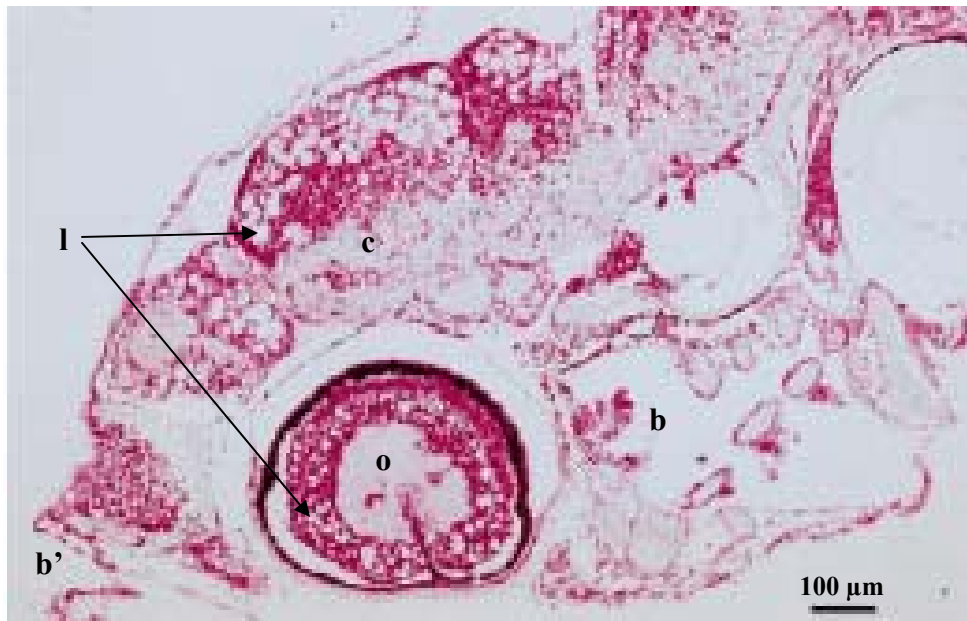
Les mortalités peuvent atteindre 100 % en élevage larvaire (Bellance et Gallet, 1988 ; Glazebrook, 1990; OIE, 1995 ; Munday et al, 2002).

b - Lésions

En microscopie électronique, les particules virales sont visibles sous forme d'arrangement paracristallin. La multiplication virale se traduit par l'observation de cellules en voie de dégénérescence et de vacuoles correspondant à la lyse totale des cellules. Ces lésions, caractéristiques de la maladie, sont visibles sur l'ensemble de l'encéphale, toute la longueur de la moelle épinière et dans la rétine (OIE, 1995 ; Peducasse, 2000). Ces lésions, réparties de manière multifocale au sein de l'encéphale, ont un aspect spongiforme (photo 2). Elles expliquent certains symptômes observés : nage en vrille, perte d'équilibre, hypersensibilité, gonflement de la vessie natatoire (régulation nerveuse).

Lors d'une infection expérimentale de loups tachetés (*Anarhichas minor*) par une souche de nodavirus (Atlantic Halibut nodavirus : AHNV), Johansen (2003) et ses collaborateurs constatent que certains poissons résistant à l'infection ne présentent aucune lésion histologique. La capacité de régénération du système nerveux central des poissons adultes (Zupanc et al, 1995) pourrait en effet masquer l'existence de lésions antérieures.

Photo 2 : Coupe longitudinale d'une larve de brochet de mer (*Lates calcarifer*) atteinte d'encéphalite virale (source : Munday et al, 2002).



b : cavité branchiale, b' : bouche, c : cerveau, l : lésions vacuolaires, o : œil

c - Pathogénie

L'infection par le nodavirus est possible par différentes voies (branchies, peau, tractus digestif). L'innervation de ces organes jouerait un rôle dans la dissémination du virus vers le système nerveux central. En effet la localisation précise du virus dans des portions de la moelle épinière ou du myélencéphale, où s'implantent les nerfs crâniens, conforte l'hypothèse d'une dissémination par voie nerveuse. Cependant, dans les études de Peducasse, le virus est mis en évidence dans d'autres tissus (estomac, intestin, branchies, muscles et peau) que le système nerveux et l'œil (Peducasse, 2000). Cette répartition serait consécutive à une dissémination par voie sanguine chez les poissons avec de fortes quantités virales dans le système nerveux central. Au sein de ces tissus, la multiplication virale n'est pas suffisante pour induire des lésions histologiques observables. La plupart des études réalisées sur la distribution du nodavirus dans différents organes ne mentionnent pas les gonades. Le discernement des organes génitaux n'est pas possible sur les poissons étudiés, souvent trop jeunes. Mushiaké et ses collaborateurs, mettent cependant en évidence des antigènes (technique ELISA) dans les gonades de géniteurs de carengues dentues âgés de 12 à 13 ans (Mushiaké et al, 1992). Ils imputent cette localisation à une multiplication virale favorisée par

le stress imposé à ces poissons (injections hormonales, élevage en eau chaude, succession des pontes...).

3 – Epidémiologie

a - Répartition

La dissémination de l'encéphalite virale dans de nombreuses écloséries et chez différentes espèces s'explique en partie par l'intensification de la production aquacole, l'augmentation des échanges mondiaux d'œufs et de larves mais aussi par l'importation de nouvelles espèces aquacoles.

D'un point de vue géographique, l'encéphalite virale a une répartition mondiale. Elle a été signalée d'abord dans l'océan Atlantique sur des bars élevés en Martinique (Bellance et Gallet, 1988), puis en Méditerranée dans des élevages de bars français, grecs et italiens (Breuil et al, 1991 ; Lebreton et al, 1997 ; Bovo et al, 1999). Dans l'océan Indien, des cas ont été enregistrés sur des ombrines subtropicales à la Réunion (Breuil comm. pers.). On enregistre aussi des cas en Australie (Glazebrook et al, 1990) avec le loup tropical et dans de nombreux élevages asiatiques (Munday et al, 2002). En mer du Nord, ce sont des élevages de flétans en Norvège et en Ecosse qui sont touchés (Grotmol et al, 1997 ; Starkey et al, 2000). L'océan Pacifique compte aussi une espèce sensible, en l'occurrence, le brochet de mer ou loup tropical (*Lates calcarifer*) à Tahiti (Renault et al, 1991).

Il n'existe pas de tropisme pour une espèce particulière et actuellement, plus d'une trentaine d'espèces de poissons sensibles sont connues (annexe 1). Elles représentent la majorité des poissons marins utilisés en aquaculture et sont regroupées en quatre groupes correspondant à la classification établie par Nishizawa pour les quatre types de nodavirus. Le virus du groupe des « mérous » (RGNNV) affecte des espèces comme le loup tropical, l'ombrine subtropicale, le bar, etc. Le flétan, la morue, le « barfin flounder » font partie du groupe des poissons plats infectés par le virus de type BFNNV et le groupe des « striped jack » (carengue dentue et spare japonaise) l'est par le virus de type SJNNV. Le dernier groupe, celui des « fugus » (*Takifugu rubripes* et cardeau hirame) correspond au type de virus TPNNV.

Les espèces touchées se retrouvent dans des régions climatiques tant tropicales (brochet de mer, ombrine subtropicale, carengue dentue, mérous, etc.) que tempérées (bar, flétan, turbot, etc.).

La grande majorité des cas répertoriés concernent des espèces marines, mais le nodavirus a aussi été isolé et identifié par culture cellulaire et RT-PCR chez une espèce de poisson d'eau douce, le guppy (*Poecilia reticulata*). Les poissons malades, apathiques et émaciés, n'ont présenté aucune perte d'équilibre ou nage en vrille (Hedge et al, 2003). Cette observation est selon les auteurs probablement liée à une contamination des guppys par des poissons marins. De rares espèces sont réfractaires au nodavirus, c'est principalement le groupe des salmonidés.

b - Facteurs prédisposants

Bien que la maladie se déclare aussi bien chez les larves que chez les poissons adultes, la pathogénicité du virus est plus marquée chez les jeunes que les adultes.

Expérimentalement la maladie est transmise de manière similaire à des bars âgés de 5 mois à deux ans. Dans tous les cas les symptômes caractéristiques de l'encéphalite virale sont observés. Cependant le taux de mortalité est plus élevé chez les larves que chez les adultes et les poissons juvéniles (Peducasse, 2000). Chez des carengues dentues âgées d'un jour, un taux de mortalité de 100% a déjà été constaté (OIE, 2000). Les mortalités enregistrées chez des bars adultes et juvéniles en Italie et en Grèce varient entre 10 et 60% (Bovo et al, 1999 ; Le Breton et al, 1997). Les adultes disposeraient d'une plus grande quantité de cellules nerveuses mature, moins vulnérables à l'infection par le nodavirus. On note cependant une sensibilité des adultes à l'infection. En effet, chez les poissons, à la différence des vertébrés supérieurs, la croissance du système nerveux est continue, offrant ainsi en permanence des cellules nerveuses jeunes et plus vulnérables à l'infection par le nodavirus (Peducasse, 2000).

La température est un facteur déterminant dans l'apparition de la maladie. La maladie est observée tant chez des espèces vivant en eaux froides comme le flétan (Grotmol et al, 1997) que d'autres vivant en eaux chaudes : mérous, loups tropicaux (Chi et al, 1997, Glazebrook et al, 1990 ; Renault et al, 1991) avec les mêmes symptômes et des mortalités importantes. Cependant, les mortalités s'accroissent avec l'augmentation de la température de l'eau. L'encéphalite virale fut qualifiée de « maladie d'été » par Bellance et Gallet car les pics épidémiologiques apparurent en Juin et semblaient être liés à l'augmentation de la température de

l'eau (Bellance et Gallet, 1988). En Grèce, dans des élevages de bars, la maladie évolue sous une forme aiguë, accompagnée également de mortalités plus importantes lors de l'élévation de la température de l'eau (25-27°C). A contrario, l'arrêt des pertes intervient après une baisse de la température (Lebreton et al, 1997). Ces observations corroborent les résultats de travaux menés sur la relation entre la température et l'évolution de la maladie. En effet, lors d'une infection expérimentale (injection intramusculaire) de deux groupes de mérous élevés à deux températures différentes, les symptômes sont plus précoces et la mortalité supérieure chez les animaux élevés à 28°C comparativement à ceux qui ont été maintenus à 16 °C (Tanaka et al, 1998). Des expérimentations menées sur des bars infectés à 25°C et d'autres à 20°C conduisent aux mêmes conclusions (Peducasse, 2000).

c - Transmission

Expérimentalement, plusieurs voies de transmission ont été testées sur des bars juvéniles: intramusculaire, intra péritonéale, orale, par bain ou cohabitation entre sujets sains et atteints. Les différences notables se situent dans le délai d'apparition de la maladie et la sévérité des symptômes. Les signes cliniques les plus précoces apparaissent avec la voie intramusculaire, deux jours après l'infection. La mortalité cumulée la plus élevée est observée avec cette même voie : 100 % en 4 jours. L'injection péritonéale ou la cohabitation, induisent une forme d'encéphalite virale subaiguë avec des mortalités (respectivement 10 % à J5 et 43% à J37) et des lésions moins sévères (Peducasse et al, 1999).

La transmission horizontale directe par cohabitation entre poissons atteints et sains, a été mise en évidence expérimentalement avec des larves de carengues dentues, loups tropicaux (Arimoto et al, 1993 ; Glazebrook et al, 1990) mais aussi avec des mérous juvéniles et des bars (Boonyaratpalin et al, 1996 ; Peducasse et al, 1999). Ce mode de contamination est lié à la présence du virus dans l'eau. Les sources de virus sont : les poissons atteints morts, les fèces et le mucus ; le virus y est détecté durant la phase aiguë de la maladie chez des bars infectés expérimentalement (Peducasse, 2000).

L'hypothèse de l'existence de porteurs asymptomatiques est émise lors de la découverte de particules virales chez des tilapias (*Oreochromis mossambicus*) infectés expérimentalement et ne présentant aucun symptôme (Skiris et Richards, 1999). Une étude rapporte qu'une souche de nodavirus isolée de dorades (*Sparus aurata*) asymptomatiques s'est révélée pathogène pour de jeunes bars (Castric et al, 2001). Ainsi certains poissons sont réceptifs mais moins

sensibles à certaines souches et peuvent être porteurs asymptomatiques de virus puis à l'origine de la contamination d'autres espèces.

Compte-tenu de la résistance du virus aux éléments physico-chimiques (Peducasse, 2000), une transmission horizontale indirecte est possible par l'intermédiaire de l'eau, des ustensiles d'élevage, du personnel. Cette voie est mise en cause en Grèce où des lots d'esturgeons du Danube (*Acipenser gueldenstaedi*) ont été contaminés par une souche virale provenant de bars élevés dans la même ferme alors que les deux lots étaient maintenus dans des circuits fermés distincts (Athanasopoulou et al, 2004). Ces hypothèses ont été aussi émises par Lebreton et ses collaborateurs (1997) après la découverte de cas de nodavirus dans une ferme grecque de bars, où aucune introduction en provenance d'un autre élevage n'a été réalisée.

L'alimentation pourrait être une autre source de contamination envisageable. Les artémias (*Artemia salina*) et les rotifères (*Brachionus plicatilis*) sont couramment utilisés pour l'alimentation larvaire des premiers jours avant la phase de nutrition à base d'aliments inertes. En 1998, l'étude de Skliris et Richards a été conduite pour détecter le virus dans les artémias et les rotifères. Quarante-huit heures après l'infection expérimentale, le virus n'était plus détectable sur ces deux organismes. Il était cependant présent lors des premières heures (1h et 4h post infection). Il s'agirait par conséquent, d'une simple contamination de surface des artémias et rotifères, dans lesquels aucune réplication du virus n'a été mise en évidence. Sur la base de ces observations, ils ne peuvent donc pas être considérés comme sources de contamination (Skliris et Richards, 1998).

La transmission verticale, des géniteurs aux larves, est une voie importante d'infection. Elle a été démontrée expérimentalement. Au cours de l'étude, le virus fut détecté par RT-PCR et ELISA Ag dans les oeufs de femelles infectées peu de temps avant et après la fécondation, mais aussi dans le cerveau des larves engendrées (Breuil et al, 2002). Une étude menée sur la répartition du virus dans les tissus de carengues dentues montre que le nodavirus est présent dans les biopsies ovariennes de géniteurs âgés (13 ans) et non chez ceux de 4 ans. La distribution du virus dans les gonades et autres organes serait imputable à la répétition du stress des pontes, à l'origine d'une contamination des œufs (Nguyen et al, 1997). Pour l'instant, le mécanisme de transmission verticale reste inconnu, nous ne savons toujours pas s'il s'agit d'une contamination de surface des œufs ou d'une contamination in ovo.

4 – Diagnostic

a – Diagnostic clinique et différentiel

La nodavirose se traduit par un tableau clinique d'incoordination motrice et d'hyperexcitabilité aboutissant à une mortalité massive. Le diagnostic différentiel doit être réalisé pour des animaux présentant une nage en spirale (« tournis ») en élevage marin.

Des symptômes similaires à ceux de l'encéphalite virale peuvent être observés lors de la maladie des bulles de gaz (« gaz-bubbles disease »). Il s'agit d'une sursaturation de l'eau par les gaz de l'air à l'origine d'embolies gazeuses et d'emphysèmes cutanés. La genèse de ces troubles s'explique par un passage à l'état gazeux des composants de l'air normalement dissous dans l'organisme du poisson. L'azote est le gaz le plus souvent mis en cause. Les accidents sont à redouter dans les eaux peu profondes (<1 m), car les animaux n'ont pas le moyen de compenser la saturation en plongeant (le taux de gaz dissous croît de 10% par mètre de profondeur). L'induction des sursaturations est due en élevage marin à un réchauffement brutal de l'eau de plus de 10°C et à l'utilisation de pompes. Les principaux symptômes sont : une mortalité brutale, une exophtalmie, une nage en cercle, un hypergonflement de la vessie natatoire... La manifestation histologique de ces troubles est proche de celle de l'encéphalite virale avec un aspect spongiforme des tissus atteints, notamment l'encéphale et la rétine. Il convient d'installer des colonnes de « désaturation » afin de prévenir ce risque.

Certains symptômes évocateurs de la nodavirose (tournis, mélanose) peuvent être aussi dus aux compressions nerveuses induites par les déformations osseuses lors d'infections par un myxozoaire : *Myxobolus cerebralis* (De Kinkelin et al, 1985)

b – Diagnostics de laboratoire

Le diagnostic de l'atteinte par le nodavirus est posé suivant différentes techniques. Certaines utilisent la mise en culture de l'agent viral et l'observation des lésions cellulaires tandis que d'autres recherchent d'antigène dans les tissus atteints ou d'ARN viral.

◆ Identification du virus par culture cellulaire

Le principal avantage de cette méthode est qu'elle témoigne de la présence du virus vivant encore infectieux. Il s'agit d'une méthode très fiable, onéreuse qui demande beaucoup de temps et peu utilisée en routine : il faut compter 3-5 jours avant de disposer des premiers résultats (OIE, 2000). Les échantillons (œil, cerveau ou larve entière) sont broyés puis centrifugés. Le surnageant est ensuite filtré à l'aide d'une membrane (0,22 µm) et les particules filtrées sont mises en culture sur des lignées cellulaires SSN-1 issues de cerveau de poissons (*Channa striatus*) (Frerichs et al, 1996). La température optimale d'incubation varie en fonction de la souche virale : BFNNV (15-20°C), TPNNV (20°C), SJNNV (20-25°C), et RGNNV (25-30°C). Les effets cytopathogènes attestant de la présence du virus sont les suivants : cellules arrondies ou granuleuses, importante vacuolisation ; ils n'apparaissent qu'au bout de 3 à 5 jours, et aboutissent à la destruction partielle voire totale du tapis cellulaire. Cette technique est plus sensible que la recherche de lésions caractéristiques de nodavirus à partir de coupes histologiques d'animaux malades, recommandée par l'OIE en 1995. En effet, la multiplication des agents viraux sur le tapis cellulaire, joue un rôle d'amplification permettant ainsi la détection d'une faible quantité virale initiale. Cependant, le principal inconvénient est le délai important nécessaire à l'obtention des résultats.

◆ La microscopie électronique

Elle offre la possibilité de visualiser directement les particules virales et leur répartition cellulaire. Grâce à cette technique, il a été possible de déterminer la taille et la morphologie du nodavirus (Mori et al, 1992). Elle est certes très utile dans l'étude des caractéristiques virales mais ne peut être envisagée comme méthode diagnostique courante. La préparation des tissus nécessite un lourd protocole non réalisable en routine.

◆ Immunofluorescence

Cette technique permet de mettre en évidence le virus contenu dans le prélèvement (cerveau, œil, tapis cellulaire infectés). Les particules virales sont reconnues par des anticorps de lapin anti-nodavirus. La révélation se fait par l'intermédiaire d'immunoglobulines couplées à de la fluorescéine. Les prélèvements traités sont ensuite observés à l'aide d'un microscope à fluorescence.

◆ Immunohistochimie

Il s'agit également d'une technique de diagnostic immunologique. Les virus présents dans les prélèvements sont visualisés par l'intermédiaire d'anticorps polyclonaux de lapin anti-nodavirus et d'anticorps anti-lapin couplés à une peroxydase. C'est cette enzyme qui permettra la coloration des échantillons positifs.

Ces trois dernières techniques ne sont pas réalisées en routine et restent réservées aux études scientifiques.

◆ Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)

Il est possible, avec cette méthode d'analyse, de détecter des particules virales (ELISA Ag) contenues dans le cerveau, les yeux et les œufs. Les avantages de cette dernière technique sont : la possibilité d'analyse d'un nombre important d'échantillons en peu de temps et son innocuité pour les poissons. Le diagnostic de la nodavirus est établi par ELISA Ag ; par ailleurs, il existe une technique ELISA Ac qui permet de déceler la présence d'anticorps anti-nodavirus contenus dans le sang de poissons ayant été en contact avec le virus.

◆ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

L'élément recherché est l'ARN viral contenu dans les tissus. La séquence de l'ARN 2 codant pour la protéine de capsid est amplifiée grâce à un couple d'amorces établi à partir du virus de l'encéphalite virale de la carengue (*Pseudocarex dentex*) : SJNNV (Nishazawa et al 1994). La détection du virus chez d'autres poissons comme les mérous (*Epinephlus akaara*, *Epinephlus moara*), les fugus (*Takifugu rubripes*), (*Oplegnatus fasciatus* et *O. punctatus*) et *Paralichthys olivaceus* (OIE, 1995) est aussi possible avec cette technique. L'ARN extrait des échantillons est d'abord rétrotranscrit en ADN à l'aide d'une reverse-transcriptase. La séquence ainsi obtenue sera reproduite par une ADN polymérase au cours de plusieurs cycles d'amplification.

Cette technique est très intéressante par sa sensibilité et pourrait s'avérer utile dans la recherche de poissons porteurs asymptomatiques (Thiery et al, 1999 ; Dalla Valle et al, 2000). Cependant, elle ne donne pas de résultats fiables sur les biopsies ovariennes des géniteurs et est par ailleurs onéreuse.

5 – Traitement et prévention

Il n'existe pas de traitement médical pour lutter contre l'encéphalite virale. Seules des mesures préventives peuvent être préconisées afin de diminuer l'incidence de la maladie.

Compte-tenu de l'existence d'une transmission verticale, la prévention sanitaire passe par une élimination de la reproduction des poissons porteurs de virus. Cette action peut être complétée par une désinfection des œufs par lavage à l'eau de mer avec de l'ozone. Le matériel et les bacs d'élevage larvaire doivent être désinfectés à l'aide de produits chimiques actifs contre le nodavirus (hypochlorite de sodium, produits iodés...). Il est recommandé d'avoir des densités en élevage larvaire n'excédant pas 15 larves par litre d'eau. Le recyclage de l'eau d'élevage est déconseillé durant cette phase (OIE, 1995, Munday et al, 2002)

Il n'existe aucun vaccin commercialisé qui pourrait être utilisé dans un programme de prévention médicale. Les différents essais d'inactivation du nodavirus (chaleur, traitements chimiques) n'ont pas permis l'obtention d'un vaccin candidat, à germe tué, efficace et présentant une innocuité suffisante. Les études menées avec des peptides de synthèse correspondant aux extrémités C et N de la protéine de capsid, montrent des productions insuffisantes d'anticorps contre le nodavirus. Ce procédé ne garantit pas une protection significative des poissons (Coeurdacier et al, 2003). Mais récemment des résultats prometteurs ont été obtenus avec des vaccins recombinants synthétisés à partir de bactéries (*Escherichia coli*) auxquelles ont été incorporées le gène de capsid du nodavirus. Trois études ont été menées avec des souches virales différentes : AHNV (Atlantic halibut nodavirus), RGNNV et SJNNV (Sommerset et al, 2005 ; Yuasa et al, 2002 ; Tanaka et al, 2001). Les vaccins ont été administrés par voie intramusculaire ou intrapéritonéale aux poissons (flétans, turbots, grisettes, mérous bagnards).

Un autre vaccin issu du génie génétique a été obtenu, en collaboration avec une équipe américaine, en recréant la structure tridimensionnelle de la protéine de capsid préalablement synthétisée « in vitro ». Le gène de la protéine de capsid est préalablement incorporé au génome d'un baculovirus. La synthèse de la protéine est réalisée en culture cellulaire d'insecte, infectée par le baculovirus modifié. Le vaccin est administré par voie intramusculaire. Les résultats des épreuves infectieuses montrent une très bonne protection avec un risque sanitaire nul (absence totale d'ARN viral). Le procédé de fabrication de ces particules (technique VLP) a été breveté aux USA (R. Thiery comm. pers.).

DEUXIEME PARTIE : MISE EN PLACE DU CONCEPT DE BIOSECURITE EN MARTINIQUE

L'aquaculture marine débute, en Martinique, dans les années 80 avec des élevages de bars. L'écloserie de l'ADAM est créée afin d'assurer la production en alevins. Dans ses élevages apparaissent, à partir de 1984, des cas d'encéphalite virale d'abord chez des juvéniles, puis chez des alevins. Les pertes engendrées sont à l'origine de l'abandon de la pisciculture du bar en Martinique (Bellance et Gallet, 1988).

Un dépistage de l'infection entre 2001 et 2002 est réalisé chez les ombrines de la station IFREMER du Robert. La présence du virus est mise en évidence par biologie moléculaire (RT-PCR) et par ELISA-Ac. Les autres analyses pratiquées par l'AFSSA indiquent que cette souche n'est détectable ni par histologie, ni par culture cellulaire. En outre, la présence du virus ne se manifeste par aucun symptôme clinique caractéristique. Aucun épisode de mortalités important n'est noté dans les élevages, comme l'indiquent les observations de Cosnefroy au cours de la période 1998 à 2001. Suite à ces découvertes, un lot d'ombrines élevé à la Réunion et en provenance de la Martinique (Station IFREMER du Robert) est atteint par l'encéphalite virale en 2002. L'hypothèse d'une contamination par l'écloserie IFREMER du Robert est émise. Les analyses alors entreprises infirment cette dernière et démontrent que la souche responsable (indo-pacifique) est différente de celle présente en Martinique. Cet événement a cependant suscité la mise en place du principe de biosécurité de l'écloserie de l'IFREMER.

Une telle politique sanitaire consiste à éliminer les poissons séropositifs dans le but de constituer des lots de reproducteurs sains, et de ne mettre en élevage que des pontes issues de ces seuls géniteurs. Les résultats de cette démarche, appliquée chez le bar, indiquent que les larves ainsi obtenues sont indemnes de virus. La phase de multiplication du nodavirus étant principalement larvaire et post larvaire, la stratégie proposée (« écloserie propre ») bloque ainsi la production massive du virus et sa circulation dans le système d'élevage. Il paraît intéressant de compléter cette action par une enquête de prévalence au sein des élevages afin d'évaluer une éventuelle contamination des alevins mis en élevage. Ma contribution à ce projet consiste en la réalisation et l'analyse d'une partie des prélèvements opérés chez les géniteurs de la station IFREMER du Robert, ainsi qu'une enquête de prévalence au sein des élevages en mer d'ombrines. Cette enquête permettra de déterminer s'il existe une contamination par le milieu extérieur (eau de mer).

Figure 3 : Plan des circuits d'eau et des bassins de la station IFREMER du Robert

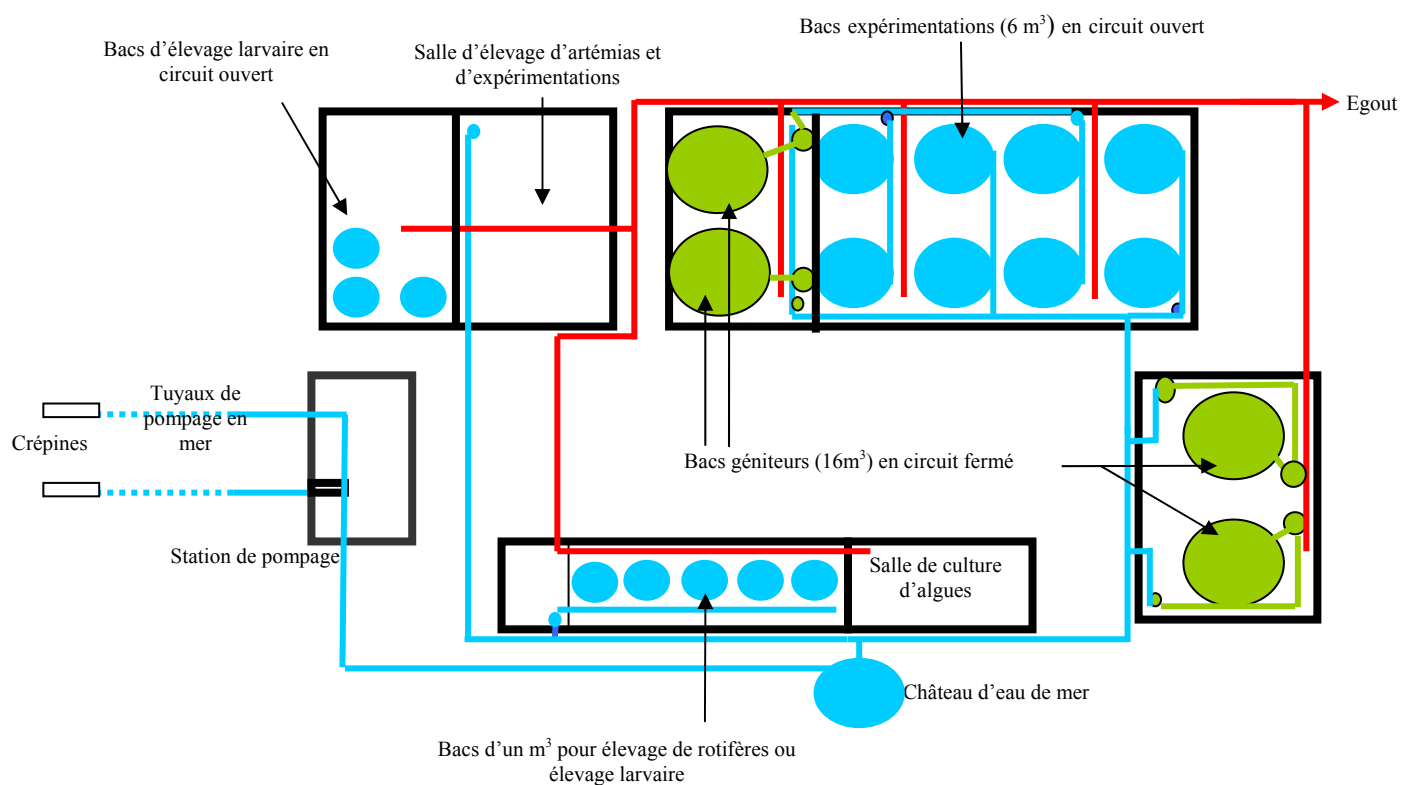


Figure 4 : Schématisation d'un bassin de géniteurs monté en circuit fermé.

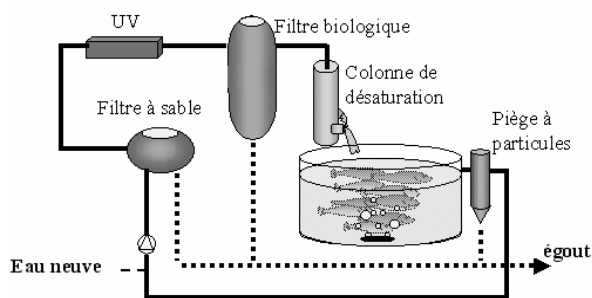
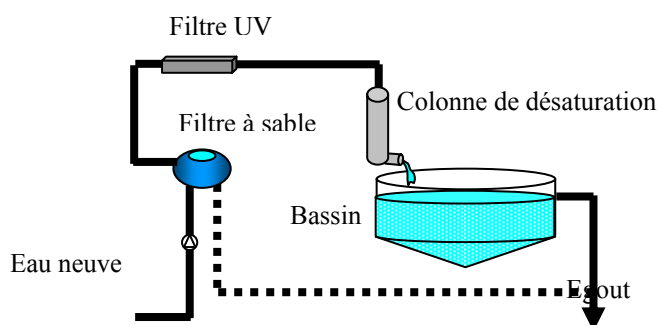


Figure 5 : Schématisation d'un bassin d'élevage larvaire



I – MATERIEL ET METHODES

1 - Les installations de la station IFREMER Martinique

La station IFREMER dispose de quatre bacs de conditionnement de géniteurs. Elle dispose de géniteurs dont une partie est élevée en bassins, en circuit fermé et contrôlé, tandis que l'autre est gardée dans des cages. Les bassins circulaires de 16 m³ sont disposés dans des salles où seule la luminosité est contrôlée pour la programmation des cycles de reproduction. Le circuit d'eau de chaque bassin est indépendant et comprend en amont : une pompe de recirculation, un système de filtration mécanique sur sable, un système de stérilisation par UV, une filtration biologique, et une colonne de dégazage. En aval, l'eau est récupérée par le fond et en surface puis conduite à un collecteur de fèces et à un bac tampon avant mise en recirculation par la pompe. L'eau du bac est recyclée à raison de 8 m³ par heure. Le débit d'arrivée d'eau extérieure est de l'ordre de 10 à 30% du volume total circulant par 24 heures. Le rejet correspondant est évacué par un système à l'égout. Ces bacs permettent de constituer des lots d'une trentaine de poissons adultes (poids moyen 5 kg) soit une charge d'élevage de 10 kg / m³ environ.

Les poissons reçoivent une alimentation quotidienne constituée d'aliments frais décongelés (calmars et poissons) et de granulés conçus pour l'ombrine subtropicale (LEGOUESSANT AQUACULTURE) et importés de Métropole.

Le circuit d'eau de l'élevage larvaire est indépendant de celui des géniteurs, le château d'eau qui les approvisionne est le seul élément commun. Les larves sont élevées dans des bassins cylindro-coniques de 2 m³ en circuit ouvert (l'eau n'est pas recyclée mais rejetée). Le système comprend aussi un filtre à sable avec une filtration UV.

2 – Sérologie des géniteurs

a - Animaux

Les lots sont constitués par plusieurs origines génétiques (de 2 à 5 origines généralement) de manière à pouvoir effectuer des croisements entre souches lors de la saison de reproduction

du lot. La traçabilité des géniteurs est possible grâce à l'implantation intramusculaire sur le flanc gauche en arrière de la tête d'une puce électronique (PIT-Tag).

b - Prélèvements

Le suivi des géniteurs prévoit au moins deux analyses par an de chaque individu en bassin. Le suivi concerne aussi les poissons élevés dans les cages et qui servent de stock d'appoint. Les prélèvements sanguins sont effectués sous anesthésie générale au même moment que les biopsies génitales permettant l'évaluation de la maturation sexuelle des géniteurs.

La station IFREMER du Robert a opté pour un protocole anesthésique à base d'essence de clou de girofle, commercialisée sous le nom d'Eugénol. Il s'agit d'un produit naturel utilisé à faible dose : 10 ppm pour les géniteurs pesant entre 2 et 9 kg.

Le sang est obtenu par ponction cardiaque (figures 6 et 7, photo 3). Le poisson est couché sur le flanc ; l'opercule et les lames branchiales sont soulevés afin de ponctionner perpendiculairement à la paroi de la chambre branchiale, à l'intersection de la ligne passant par le sommet de l'œil et le bord antérieur de la nageoire pectorale avec le bord postérieur de la dernière paire de branchies (figure 7). Le prélèvement est réalisé à l'aide d'une aiguille de 0.8 x 40 mm (ou 0.5 x 16 mm pour les poissons plus petits) montée sur une seringue de 1 ou 2 ml. Sachant que le sang des poissons représente 5% de leur poids corporel, il est possible de prélever sans inconvénients le 1/5 soit environ 3 ml pour un poisson de 300 g ou 10 ml pour un de 1 kg (De Kinkelin et al, 1985). Le sang prélevé (0.5 à 2 ml généralement) est laissé à température ambiante pour qu'il coagule. La centrifugation s'effectue à 6000 tours.min⁻¹ pendant 5 minutes; le sérum ainsi isolé est conservé à – 20° C jusqu'à l'analyse.

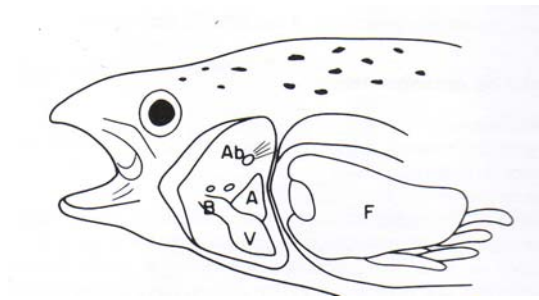


Figure 6

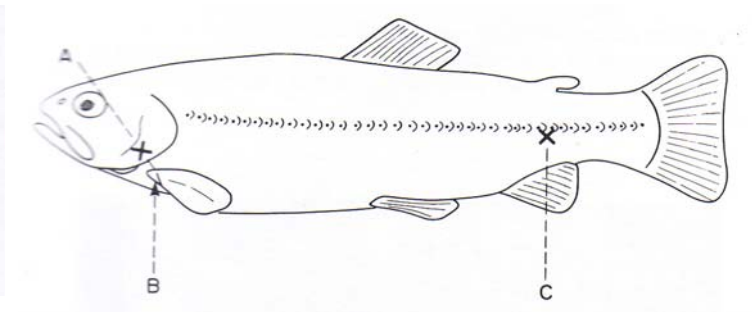


Figure 7

Figure 6 : Schéma anatomique de la région cardiaque (A : atrium, B : bulbe aortique, V : ventricule, Ab : Arcs branchiaux)

Figure 7 : Schéma indiquant le repérage des points de ponction sanguine chez un poisson vivant (A : point de ponction de l'atrium ; B : point de ponction du ventricule ; C : point de prélèvement pour le vaisseau dorsal)



Photo 3 : Prise de sang à l'atrium d'une ombrine subtropicale (géniteur, source : ifremer)

b - Analyse ELISA Ac

Parmi les techniques diagnostiques, seule la recherche d'anticorps sériques par la méthode ELISA permet une détection sur des animaux vivants (Breuil, 1997 ; Breuil et Romestand, 1999). Les autres méthodes disponibles (RT-PCR, ELISA antigène) permettent d'isoler le virus dans certains organes (œil, cerveau, intestin...) mais les résultats obtenus avec les biopsies ovariennes chez les reproducteurs ne sont pas fiables (Breuil et al, 2002).

◆ Obtention d'Ig G anti-Ig M d'ombrine

La transposition à l'ombrine, de l'ELISA anticorps mise au point pour le bar (Breuil et Romestand, 1999) a nécessité certaines modifications. Des IgM d'ombrines sont purifiées par chromatographie à partir d'un pool de sérums en provenance de la Martinique. Les fractions correspondant aux poids moléculaires des IgM de poissons sont récupérées, puis concentrées par centrifugation (Breuil, 1997). Un lapin est immunisé dans un premier temps par une injection par voie sous cutanée de 1 mg d'IgM d'ombrine en présence d'adjuvant incomplet de Freund ; les rappels sont réalisés avec des injections simples d'IgM d'ombrines. En fin d'immunisation, le lapin est sacrifié, le sang est récolté et les IgG sont purifiées sur colonne protéine A.

◆ Biotinylation des IgG anti-Ig M d'ombrine

Cinq millilitres de la suspension d'IgG concentrée à 1,96 mg/ml sont mis dans un tube à dialyse et dans du tampon tétraborate (0,05 M) à un pH égal à 8,4. La dialyse s'effectue durant 24 h. La biotinylation des IgG est réalisée avec un ester sulfo-NHS à raison de 370 µg d'ester pour 10 mg d'IgG. L'ensemble est mis en agitation pendant deux heures. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de chlorure d'ammonium (20 µl de solution de NH₄Cl pour 250 µg d'ester). Les IgG biotinylées obtenues sont dialysées dans du PBS pendant 48 heures puis filtrées (filtre de 0,22 µ). Elles sont conservées à une température de + 4°C.

◆ Obtention des sérums de contrôle

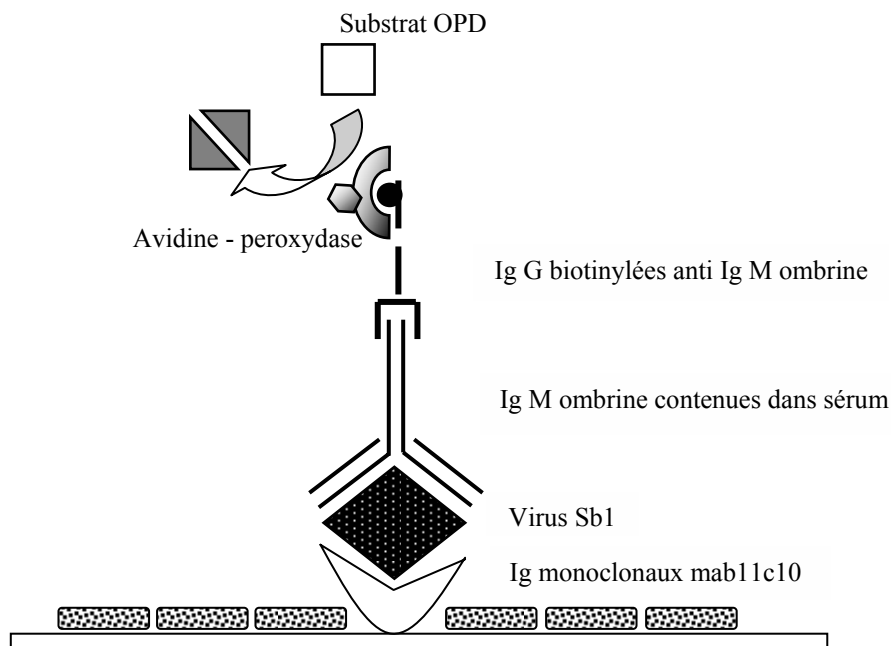
Le contrôle positif utilisé au début, était un pool de sérums de quatre ombrines immunisées contre une souche virale Méditerranéenne du bar. Durant les analyses, nous avons constaté une dégradation des densités optiques engendrées par ce standard et avons eu recours à un autre standard positif issu d'un sérum d'ombrine fortement positif.

Des poissons ne présentant pas de symptômes sont testés en ELISA. Les densités optiques obtenues sont faibles comparativement au contrôle positif. Des adjonctions croissantes de virus permettent l'extinction progressive du signal. Le pool de sérum réalisé comme contrôle négatif est constitué à partir de sérums donnant des densités optiques inférieures à celles des sérums inactivés.

◆ Protocole de dosage des anticorps par ELISA

Les plaques sont « coatées » une nuit à +4°C avec 50 µl par puits d'une solution d'anticorps monoclonaux de souris (mab 11C10) anti-nodavirus à 3 µg/ml. Elles sont rincées trois fois avec du PBS (phosphate buffered saline). Pour éviter la fixation non spécifique, le blocage est réalisé avec 300 µl de PBS-lait en poudre 5%. Les plaques sont incubées à 37°C pendant une heure, puis rincées trois fois avec du PBS. Chaque puits reçoit 50 µl de suspension virale. Cette dernière est obtenue à partir de la mise en culture cellulaire d'une souche isolée dans des élevages de bars en Atlantique (sb1). Elle est concentrée à 4 µg de protéines / ml. Les plaques sont de nouveau incubées une heure à 37°C, rincées trois fois avec du PBS, puis conservées à – 20°C jusqu'à utilisation.

Figure 8 : Schéma de la technique ELISA anticorps utilisée



Les échantillons de sérum et le contrôle positif sont dilués au 1/400 dans du PBS- poudre de lait 0.5% ; deux fois 50 µl sont déposés en duplicats dans les puits. Le sérum contrôle négatif est dilué au 1 / 400 et occupe 4 puits. La plaque est incubée pendant une heure à 37°C, puis rincée trois fois avec une solution de PBS Tween à 0.05%. Des IgG biotinylées de lapin anti-IgM d'ombrine diluées au 1/1000 sont ajoutées. L'incubation dure une heure à 37°C. Après un triple rinçage au PBS Tween 0.05%, une solution d'avidine couplée à de la peroxydase, diluée au 1/2500 dans du PBS-poudre de lait à 0.5%, est adjointe pendant 30 min à 37°C. La

réaction chromogène a lieu après ajout de l'orthophenyldiamine (OPD). La plaque est placée à l'obscurité pendant 10 min. L'arrêt de la réaction s'effectue par acidification du milieu avec 25 µl d'acide sulfurique (H₂SO₄) 4N par puits. La lecture des densités optiques se réalise à l'aide d'un spectrophotomètre calibré à 492 nm.

Un sérum sera considéré comme positif (non-négatif) s'il présente une densité optique (DO) supérieure à un seuil équivalant à $m + 5s$, « m » la moyenne des DO du témoin négatif et « s » étant l'écart type résultant des analyses de plusieurs sérums négatifs testés sur une plaque. Ainsi selon l'inégalité de BienAymé-Tchebitchef, le sérum dont la DO est supérieure à ce seuil est significativement différent ($p < 0,04$) du standard négatif (Breuil et al, 2001).

3 – Contrôle des larves

L'objectif de cette étape est de contrôler l'absence du nodavirus chez les larves issues de géniteurs séronégatifs sélectionnés.

a - Prélèvements

Les pontes issues des géniteurs séronégatifs sont contrôlées par ELISA Ag à plusieurs instants : J1, J10 et J20. Nous recherchons ici des particules virales (antigènes) contenues généralement dans le cerveau et les yeux. Les larves sont prélevées entières, puis congelées. Elles sont ensuite broyées puis diluées au 1/4 dans du PBS.

b - Analyse ELISA Ag

Les deux premières étapes sont en tous points identiques à celles de l'ELISA Ac. Les échantillons sont dilués au 1/500. Deux fois 50 µl sont placées dans les puits, puis la plaque est incubée durant une heure à 37°C. La plaque est rincée trois fois avec une solution de PBS-tween à 0,05%.

Cinquante microlitres d'eau oxygénée à 0,5% sont ajoutés par puits. La plaque est placée une demi-heure à 37°C, puis rincée trois fois avec du PBS-Tween à 0,05%. Cinquante microlitres d'IgG biotinylées de lapin anti-nodavirus diluées au 1 / 1000, sont ajoutés par puits. La plaque est incubée pendant une heure à 37°C. Les trois dernières étapes sont similaires à la méthode ELISA Ac décrite précédemment.

4 - Contrôle et validation du concept de biosécurité: étude épidémiologique chez les producteurs

a – Choix de la population

L'objectif de cette enquête est de contrôler l'évolution du statut sérologique des larves indemnes placées en élevage (pleine mer).

Nous avons réalisé dans un premier temps une enquête sur quatre élevages de l'île, afin d'établir un bilan initial. Les prélèvements concernent des poissons d'un an (poids moyen de 1kg). Nous ne disposons d'aucune enquête préliminaire réalisée sur la prévalence du nodavirus dans les élevages. Nous pensons estimer une prévalence de 10 % et désirons une précision absolue de 5 %. La détermination de la taille des échantillons est conditionnée par deux facteurs que sont la proportion d'animaux atteints que l'on cherche à évaluer et la précision relative. Cette dernière se définit comme le rapport des valeurs de la précision absolue sur celle de la prévalence estimée, dans notre cas elle est égale à 50 %. Ces données nous permettent de fixer la taille de nos échantillons suivant des tables (Toma et al, 2001) à 140 individus.

Dans un deuxième temps, un suivi sérologique est mené dans un élevage pour mettre en évidence une éventuelle évolution dans le temps de la prévalence. A chaque échantillonnage, 140 poissons sont testés, à deux mois d'intervalle. Lors de la première série de prélèvements les poissons sont âgés de 6 mois et pèsent en moyenne 300 grammes.

Les poissons prélevés sont tous issus de géniteurs indemnes et de lots négatifs lors des tests par RT-PCR, culture cellulaire et ELISA Ag effectués en phase larvaire.

b - Réalisation des prélèvements

Pour les poissons de taille commercialisable, les prélèvements sont réalisés après abattage des animaux, juste avant leur éviscération. Le sang est collecté par ponction au sinus veineux et ensuite placé dans un eppendorf.

Pour le suivi sérologique du site E, une anesthésie à base d'essence de clou de girofle (Eugénol à 25 ppm soit 1 ml pour 40 l d'eau de mer) est pratiquée sur les poissons prélevés qui sont ensuite replacés en élevage.

c – Analyses

Les prélèvements ont été analysés à la station IFREMER de Palavas-les-flots suivant le même protocole ELISA Ac employé au laboratoire de la station Martinique pour la sélection des géniteurs.

II – RESULTATS

1 – Sélection des géniteurs

Lors du suivi des géniteurs de la station IFREMER du Robert, à chaque série de prélèvements, tous les poissons du bassin ou de la cage sont prélevés.

♦ Sérologie en bassins

Le suivi des lots de géniteurs utilisés pour l'obtention des pontes, durant ces trois dernières années est présenté la figure 9. Le tableau 4 mentionne les données chiffrées obtenues ainsi que des résultats complémentaires issus des analyses des lots de pré-géniteurs (lot 5, 6 et 7).

Les deux dernières colonnes de ce tableau indiquent le numéro d'identification des poissons positifs à chaque série d'analyses : dans l'avant dernière colonne figurent les poissons qui sont séropositifs pour la première fois, tandis que la dernière comporte ceux qui sont séropositifs à deux analyses successives. La provenance de certains animaux introduits dans ces bassins est indiquée entre parenthèses et les poissons éliminés sont signalés par une astérisque.

Figure 9 : Evolution du taux de séropositifs dans les principaux lots de géniteurs en bassins de 2002 à 2004

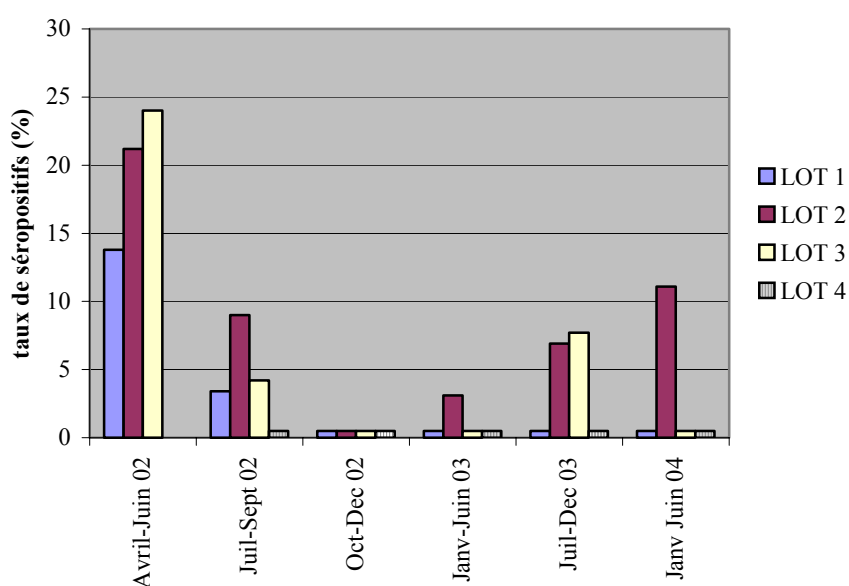


Tableau 4 : Suivi sérologique des lots de géniteurs maintenus en bassins

Origine des lots	bassin d'élevage	date de prélèvement	Nombre de poissons séropositifs / total de poissons prélevés et présents dans le bassin	taux de séropositifs en %	statut sérologique antérieur et origine des poissons trouvés séropositifs	
					négatif	positif
LOT 1 : poissons importés de Caroline du Sud en Mai et Octobre 1999	G4	23/05/02	4 / 29	13,8		3110*
	G4	23/08/02	1 / 29	3,4		
	G1	15/11/02	0 / 28	0		
	G1	26/02/03	0 / 26	0		
	G1	24/07/03	0 / 30	0		
	G1	28/04/04	0 / 30	0		
LOT 2 : poissons importés de Caroline du Sud et de Floride en Octobre 1998	G2	30/05/02	7 / 33	21,2		6978*, 1287*
	G2	22/08/02	3 / 33	9	9386*	
	G2	05/11/02	0 / 28	0		
	G2	11/03/03	1 / 32	3,1	3248 (<u>E1</u>)	
	G2	20/08/03	2 / 29	6,9	0174, 6477	
	G2	17/05/04	3 / 27	11,1	2569 (<u>C4</u>), 4626, 19386	
LOT 3 : poissons importés en 1987 et 1996	G2	1/12/04	2 / 27	7,4		4626, 19386
	G3	31/05/02	6 / 25	24		681D*
	G3	27/08/02	1 / 24	4,2		
	G3	14/11/02	0 / 20	0		
	G3	25/02/03	0 / 20	0		4862* (<u>C2</u>)
	G3	22/07/03	2 / 26	7,7	4E4C*	
LOT 4 : Poissons nés à la station IFREMER en Janvier 2002	G3	26/04/04	0 / 23	0		
	G?	18/09/02	0 / 49	0		
	G4	02/12/02	0 / 49	0		
	G4	24/02/03	0 / 47	0		
	G4	25/07/03	0 / 43	0		
LOT 5 :	G4	27/04/04	0 / 40	0		
	E2	04/11/02	4 / 25	16		
	E2	06/12/02	1 / 21	4,8	9202	
LOT 6	E2	28/02/03	1 / 26	3,8		9202
	E1	25/09/02	6 / 27	22		
LOT 7	<u>E1</u>	14/10/02	0 / 23	0		
	E4	25/02/03	0 / 98	0		
	E1	29/07/03	0 / 47	0		

* poissons éliminés

LOT 5 et 6 : poissons nés à la station en Janvier 2001 / **LOT 7 :** poissons nés à la station en Juin 2002

L'évolution du taux de séropositifs est très disparate en fonction des lots. Nous observons en effet une décroissance de la séropositivité dans le lot 1, jusqu'à atteindre une valeur nulle entre Octobre et Décembre 2002. Aucun autre poisson n'est déclaré positif dans ce lot par la suite.

Dans le lot 2 nous constatons tout d'abord une diminution notable du taux de séropositifs. Cependant, il augmente à partir de Mars 2003 pour finalement atteindre la valeur de 7.4% au premier semestre 2004.

Nous remarquons comme dans les deux lots précédents, une diminution du pourcentage de séropositifs dans le lot 3 durant l'année 2002. Entre Juillet et Décembre 2003, de nouveaux poissons séropositifs seront découverts puis éliminés.

Le lot 4 est le seul lot à ne présenter aucun poisson séropositif durant tout le suivi.

Seuls les lots 5 et 6 contiennent des poissons séropositifs. L'élimination de ces poissons a permis l'assainissement du lot 6 contrairement au lot 5 où apparaît un poisson séropositif qui ne sera pas éliminé par la suite (poisson n°9202).

Tableau 5 : Résultats sérologiques des lots de géniteurs maintenus en cages

LOT	cage d'élevage	date de prélèvement	Nombre de poissons séropositifs / total de poissons prélevés et présents dans la cage	taux de séropositifs en %	précédent statut sérologique des poissons	
					négatif	positif
LOT 8	C1	18/09/02	35 / 74	47		
	C1	08/10/02	33 / 73	45		
	C1	04/12/02	2 / 34	5,9		2603, 6308
LOT 9	C4	06/11/02	22 / 63	35		
	C4	26/11/02	2 / 43	4,7		4862, 8303
LOT 10	<u>C2</u>	18/03/03	6 / 76	2,6	8845, 2578, 7115	2603, 6308, 4862
	C2	05/08/03	5 / 56	8,9	8929, 5105	8845, 2578, 2603, 6308
	C2	22/04/04	9 / 54	16,6	6466, 6960, 3586, 8303, 7030, 0770, 7820	8929, 5105
LOT 11	C2	29/11/02	4 / 51	7,8		
	<u>C4</u>	12/08/03	1 / 42	2,4	9167	
	C4	18/05/04	5 / 30	17	2168, 0937, 4771, 6789, 2377	
LOT 12	C5	12/08/03	0 / 44	0		
	C5	18/05/04	0 / 39	0		

LOT 8 et 9 : poissons nés à la station IFREMER du Robert en Janvier 2001 et élevés dans deux cages différentes (duplicats des lots 5 et 6)

LOT 10 : il s'agit du LOT 8 et 9 réunis au début de l'année 2003

LOT 11 : poissons importés de Floride et Caroline du Sud en Octobre 1998 élevés en cage (duplicat du lot 2)

LOT 12 : poissons nés à la station IFREMER du Robert en Juin 2002 (duplicat du lot 7)

◆ Sérologie en cages

Les lots élevés en cages à la station IFREMER du Robert sont généralement des duplicats de certains lots maintenus en bassins. Les résultats obtenus avec les poissons en cages montrent une baisse de la séroprévalence entre les années 2002 et 2003 dans les lots 8, lot 9 et 11 (tableau 5). Nous notons cependant entre 2003 et 2004, une augmentation du taux de séropositifs dans les lots 10 et 11. Sur les deux séries d'analyses effectuées sur le lot 12, nous n'avons trouvé aucun poisson séropositif.

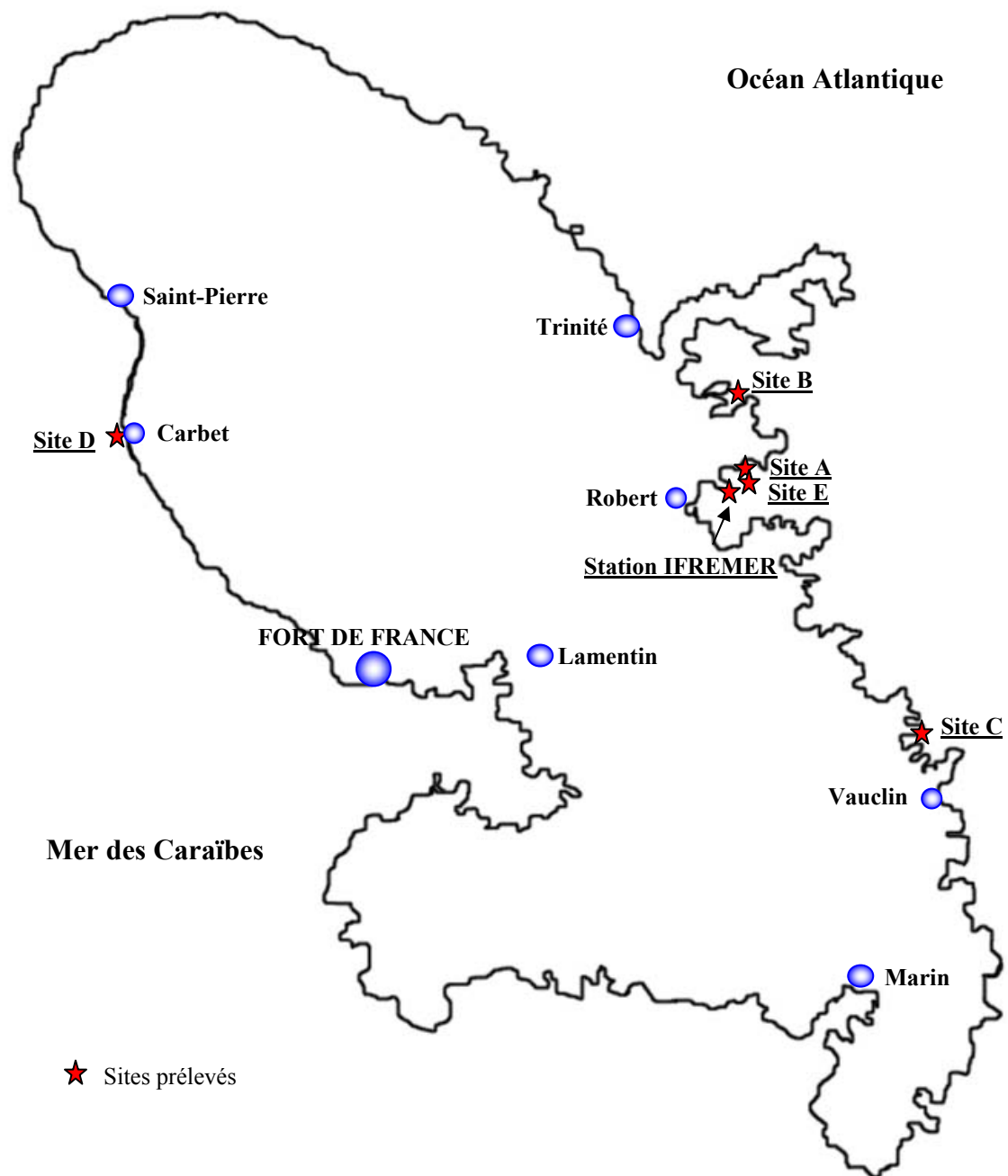
La politique menée par la station IFREMER se traduit par une baisse notable du nombre de poissons séropositifs tant en bassins qu'en cages (tableau 6).

En effet, en bassin au début de l'année 2002, sur les 136 poissons testés 17 étaient séropositifs soit 12,5 %, en 2003 les analyses réalisées révèlent 1 séropositif sur 125 poissons testés. Durant l'année 2004, sur les 120 poissons prélevés 3 s'avèrent être séropositifs soit 2,5 %. De même en cage en 2002, sur les 188 poissons prélevés, 61 sont séropositifs (32,4 %). En 2003 nous avons 6 poissons séropositifs sur 142 dépistés soit 4,2 %. Enfin lors de l'année 2004, les résultats montrent 14 séropositifs sur 123 poissons testés (11,7 %).

Tableau 6 : Evolution de la séropositivité du cheptel de la station IFREMER Martinique de 2002 à 2004

	2002		2003		2004	
	nombre de poissons séropositifs / nombre de poissons testés	taux de séropositifs (%)	nombre de poissons séropositifs / nombre de poissons testés	taux de séropositifs (%)	nombre de poissons séropositifs / nombre de poissons testés	taux de séropositifs (%)
lots en bassins	17 / 136	12,5	1 / 125	0,8	3 / 120	2,5
lots en cages	61 / 188	32,4	6 / 142	4,2	14 / 123	11,4

Figure 10 : Répartition géographique des élevages prélevés.



2 – Contrôle des larves

Depuis septembre 2002, tous les échantillons de larves issues des pontes des géniteurs de l'IFREMER ont été testés avec la technique ELISA Ag. Les analyses sont toutes négatives. Par ailleurs, un contrôle officiel effectué à l'AFSSA par RT-PCR et culture cellulaire sur ces échantillons corrobore ces résultats. Nous pouvons donc considérer que toutes les larves issues de ces géniteurs sont indemnes de nodavirus

3 – Contrôle et validation du concept : estimation de la prévalence dans certains élevages

Sur l'ensemble des 590 poissons prélevés durant cette enquête (figure 10 et tableau 7) seuls trois poissons sont positifs. Les trois séropositifs appartiennent tous au même élevage (site D), ce qui correspond à 2 % de séropositifs dans cet échantillon. Aucun poisson séropositif n'a été découvert dans les trois autres exploitations.

Le suivi des larves indemnes élevé sur le site E n'a révélé qu'un poisson séropositif sur 143 prélevés lors de la dernière série d'échantillonnage. C

Tableau 7 : Suivi des alevins indemnes de nodavirus placés dans différentes exploitations.

	nombre de séropositifs / nombre de poissons prélevés	Pourcentage de séropositifs dans les échantillons
site A	0 / 148	0
site B	0 / 147	0
site C	0 / 148	0
site D	3 / 147	2
suivi 1 (05/07/04) du site E	0 / 149	0
suivi 2 (10/09/04) du site E	0 / 149	0
suivi 3 (18/11/04) du site E	1 / 143	0,7

III – DISCUSSION

L'enquête sur les poissons d'élevage a été réalisée afin de déterminer l'existence d'une contamination des larves indemnes livrées aux producteurs. Elle nous permet aussi d'établir un bilan sur la situation du nodavirus dans ces ateliers de production. Il s'agit de la première étude de ce type effectuée sur des ombrines en Martinique. Dans l'ensemble, nous avons trouvé peu de poissons séropositifs. Ces résultats attestent d'un faible contact entre le nodavirus et les poissons en grossissement. Dans un élevage (site D) 2 % des poissons de l'échantillon s'avèrent être séropositifs. L'échantillonnage a été établi afin d'estimer une prévalence de l'ordre de 10 %. Pour estimer avec une précision satisfaisante une prévalence de 2 %, il aurait fallu prélever un nombre plus important de poissons (1300). Une telle entreprise est difficilement envisageable dans le contexte de production artisanale en Martinique. D'autres données obtenues dans des régions où l'aquaculture est plus intensive qu'en Martinique (Asie et Méditerranée), reflètent une situation différente. A Singapour, lors d'une recherche d'anticorps anti-nodavirus sur 112 loups tropicaux (*Lates calcarifer*), 9 % des analyses étaient positives (Huang et al, 2001). En France (Palavas-les-flots), sur 41 bars (*Dicentrarchus labrax*) pêchés 7 étaient séropositifs, soit 17% de cette pêche (Breuil et al, 2000). Certes ces dernières données ne sont pas représentatives, mais elles pourraient traduire une contamination du milieu par d'importantes quantités de nodavirus provenant d'écloseries avoisinantes contaminées. Ce phénomène n'existerait pas en Martinique.

Sur le site à l'Ouest de l'île (site D), trois poissons sont séropositifs. Nous pouvons expliquer ces résultats par deux hypothèses :

- la présence de populations sauvages et commensales à l'élevage, vectrices de nodavirus ;
- l'entreprise installée sur ce site dispose d'un petit atelier larvaire, qui pourrait être contaminé par du nodavirus et en libérer à proximité des cages. Les larves produites sur place permettent de constituer des lots supplémentaires dans leur atelier de grossissement. Les poissons testés sur ce site sont tous issus de larves produites à l'IFREMER du Robert, considérées indemnes de nodavirus.

Initialement, le suivi cinétique devait être réalisé sur plusieurs élevages mais seul un aquaculteur a voulu participer au projet. Nous avons identifié chez ce dernier un seul poisson séropositif lors de la troisième série de prélèvements.

Les résultats obtenus dans les élevages martiniquais contrastent avec ceux de la station IFREMER du Robert où l'on compte un nombre plus important de poissons séropositifs. En

effet, en 2002 certains lots en bassin comportaient jusqu'à 24 % de séropositifs (lot 3), de même dans des lots en cages le taux de séropositifs atteignait 47 %. En 2004, un lot en bassin (lot 2) comporte encore deux poissons séropositifs. En cage, deux lots sur trois comprennent toujours des poissons séropositifs. Malgré les consignes de sélection des géniteurs, nous constatons une persistance des séropositivités.

Cette dernière est inhérente à des erreurs de gestion du cheptel. En effet, certains animaux séropositifs n'ont pas été éliminés et représentent une source de virus dans l'élevage. Le maintien de la séropositivité plus marquée en cages (lot 8, lot 9, lot 10) s'explique par une sélection appliquée en priorité aux poissons en bassin (à l'origine de toutes les pontes) aux dépens de celle réalisée sur le cheptel en cages. En outre, certains poissons séropositifs ont été introduits en bassins. Ces entrées d'animaux probablement porteurs et excréteurs de virus, peuvent être mises en relation avec l'apparition de nouveaux séropositifs dans certains lots (lot 2 et 3).

Afin de poursuivre l'assainissement du cheptel, il paraît indispensable d'éliminer rigoureusement tous les poissons séropositifs et de mettre en place un bac de quarantaine où séjourneraient les poissons choisis pour les introductions et dans l'attente des résultats d'analyses sérologiques.

Quelle est l'origine de la souche virale présente en Martinique ?

Les premiers lots d'ombrines importés en Martinique ont été élevés sur le site où sont apparus les cas de nodavirus à la fin des années 80. Ces poissons ont été vraisemblablement contaminés par les bars infectés durant cette période. Ces lots d'ombrines, ensuite transférés à la station IFREMER, seraient à l'origine de l'introduction du virus dans le cheptel.

Contrairement aux observations faites en Corée sur des larves d'ombrines (Oh et al, 2002) et à la Réunion, l'infection des poissons en Martinique ne s'est manifestée par aucun symptôme caractéristique (« tournis », mortalité larvaire massive...). Lors des dernières sérologies, un poisson plusieurs fois séropositif, présentant un retard de croissance marqué, a été sacrifié afin d'effectuer une recherche de nodavirus à partir du cerveau et des yeux. Une souche virale a été mise en évidence en culture cellulaire et immunofluorescence (Breuil comm. pers.). Ces résultats confirment l'existence du nodavirus en Martinique. Sa présence dans le cheptel de l'IFREMER du Robert s'est probablement traduite par des symptômes frustes (retards de croissance, amaigrissement, mortalités ponctuelles) passés inaperçus. Des analyses RT-PCR montrent que la souche virale présente en Martinique est apparentée à la souche sb1 isolée à partir de bars élevés en Atlantique et appartient au génotype RGNNV. Or le virus responsable

de la mortalité en élevage larvaire (80-90%) en Corée correspond au génotype SJNNV, tandis que celle isolée sur les ombrines atteintes à la Réunion est identique à la souche sb2 (génotype RGNNV) identifiée dans des élevages de bars en Méditerranée. L'ombrine serait donc plus sensible à certaines souches. Une étude de Breuil et ses collaborateurs met en évidence une différence de pathogénicité des souches virales sb1 et sb2 en fonction de l'âge et de la température. La souche sb2 serait plus pathogène pour des poissons juvéniles et adultes. A contrario, la souche sb1 serait plus néfaste pour des poissons au stade larvaire. Par ailleurs, la pathogénicité de la souche sb1 est plus marquée à des températures basses (14-15°C) tandis que celle de la souche sb2 l'est à une température plus élevée (25°C). Tous ces éléments sont en faveur d'une faible pathogénicité de la souche de nodavirus présente en Martinique pour l'ombrine subtropicale.

Faute de technique diagnostique directe fiable et réalisable sur des poissons vivants, l'ELISA-Ac reste la plus intéressante pour le suivi des géniteurs. Elle présente de nombreux avantages : rapidité, faible coût et prélèvements sur des poissons vivants. Cependant au cours de nos analyses nous avons été confrontés à des problèmes de conservation des sérums de contrôle. Les immunoglobulines contenues dans ces sérums témoins sont des Ig M qui se conservent moins bien que les Ig G. Ces observations sont comparables à celles faites par une équipe israélienne travaillant sur la pasteurellose de poissons hybrides (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*) (Nitzan et al, 2003). Dans l'optique d'une standardisation de la technique, les méthodes de conservation des Ig M devraient être améliorées. Nous pourrions aussi envisager l'utilisation d'Ac monoclonaux de souris pour la révélation, afin d'accroître la spécificité de la méthode.

CONCLUSION

Ce concept de biosécurité a fait ses preuves de manière expérimentale en France avec le bar et au Japon dans des écloseries de « barfin flounder » (Watanabe et al, 2000). Cette démarche est entreprise, au stade production, à la station du Robert en Martinique depuis trois ans ; des lots de géniteurs séronégatifs ont pu être constitués principalement en bassin. Cette étude nous a cependant permis de mettre en exergue des défaillances au niveau de la gestion des stocks de géniteurs à la station IFREMER du Robert. L'enquête réalisée dans les élevages de Martinique atteste d'une faible contamination des larves par le milieu extérieur. L'IFREMER du Robert doit maintenir le travail d'assainissement de ses reproducteurs, garantie d'une qualité des larves produites pour la filière martiniquaise et pour les échanges avec d'autres îles (Guadeloupe, Cuba, Réunion). Par contre, des mesures de dépistage du nodavirus sur les importations d'autres espèces (cobia) plus sensibles au nodavirus et susceptibles d'introduire une souche virale plus pathogène, devraient être envisagées par les principaux acteurs de la filière et les autorités locales.

Nous avons pu certes établir un premier bilan sur la présence du nodavirus dans les élevages martiniquais, mais certaines questions restent en suspens :

- Quel est le génotype de la souche virale présente en Martinique ?
- Existe-t-il des espèces sauvages porteuses de nodavirus ?
- Quelle est la réelle pathogénicité de cette souche pour l'ombrine et les espèces autochtones ?

D'autres études s'avèrent indubitablement nécessaires pour promouvoir cette filière, qui pourrait être un atout du développement économique de l'île.

BIBLIOGRAPHIE

- ARIMOTO M., MORI K., NAKAI T., MUROGA K., FURUSAWA I.
Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Journal of fish diseases*, 1993, **16**, 461-469.
- ARIMOTO M., SATO J., MARUYAMA K., MIMURA G., FURUSAWA I.
Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 1996, **143**, 15-22.
- ATHANASSOPOULOU F., BILLINIS C., PRAPAS T.
Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece : first incidence of nodavirus infection in *Acipenser sp.* *Diseases of aquatic organisms*, 2004, **60**, 247-252.
- BECKMAN D.W., WILSON C.A., STANLEY A.L.
Age and growth of red drum, *Sciaenops ocellatus*, from offshore waters of the northern Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin*, 1988, **87**, 17-28.
- BELLANCE R., GALLET DE SAINT-AURIN D.
L'encéphalite virale du loup de mer. *Caraïbes Médical*, 1988, 105-144.
- BOONYARATPALIN S., SUPAMATTAYA K., KASORNCHANDRA J., HOFFMAN R.W.
Picorna-like virus associated with mortality and a spongy encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Diseases of aquatic organisms*, 1996, **26**, 75-80.
- BOVO G., NISHIZAWA T., MALTESE C., BORGHESEAN F., MUTINELLI F., MONTESI F., DE MAS S.
Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus research*, 1999, **63**, 143-146.
- BREUIL G., BONAMI J.R., PEPIN J.F., PICHOT Y.
Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 1991, **97**, 109-116.
- BREUIL G.
Le système immunitaire du bar *Dicentrarchus labrax*. Immunoglobulines. Cellules productrices d'immunoglobulines, ontogenèse. Application à une pathologie virale néonatale. Th. : Parasitologie : Montpellier, Université Montpellier II : 1997. 217 p.
- BREUIL G., ROMESTAND B.
A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*(L.) : application to the screening of the spawners in a sea bass hatchery. *Journal of fish diseases*, 1999, **22**, 1, 45-52.

BREUIL G., PEPIN J.F., CASTRIC J., FAUVEL C., THIERY R.

Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass : application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bulletin of european association of fish pathologist*, 2000, **20**, 3, 95-100.

BREUIL G., MOUCHEL O., FAUVEL C., PEPIN J.F.

Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Diseases of aquatic organisms*, 2001, **45**, 25-31.

BREUIL G., PEPIN J.F., BOSCHER S., THIERY R.

Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of fish diseases*, 2002, **25**, 697-702.

CASTRIC J., THIERY R., JEFFROY J., DE KINKELIN P., RAYMOND J.C.

Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of aquatic organisms*, 2001, **47**, 33-38.

CHI S.C., LO C.F., KOU G.H., CHANG P.S., PENG S.E., CHEN S.N.

Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck and Schelgel). *Journal of fish diseases*, 1997, **20**, 185-193.

CHI S.C., LIN S.C., SU H.M., HU W.W.

Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and in grouper larvae. *Virus research*, 1999, **63**, 107-114.

COEURDACIER J.L., LAPORTE F., PEPIN J.F.

Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and shellfish immunology*, 2003, **14**, 5, 435-447.

COMPS M., PEPIN J.F., BONAMI J.R.

Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 1994, **123**, 1-10.

COSNEFROY E.

L'élevage de l'ombrine (*Sciaenops ocellatus*) en Martinique, problèmes pathologiques.

Th. D : NANTES, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 2000, TH4. 127 pages.

DALLA VALLE L., ZANELLA L., PATARNELLO P., PAOLUCCI L., BELVEDERE P., COLOMBO L.

Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of fish diseases*, 2000, **23**, 321-327.

DELSERT C., MORIN N., COMPS M.

Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell cultures. *Journal of virology*, 1997, **71**, 7, 5673-5677.

FAO Service des ressources des eaux intérieures et de l'aquaculture.
Etat de l'aquaculture dans le monde. FAO Circulaire sur les pêches, n°886, rev 2. Rome, FAO. 2003. 114 p.

FITZHUGH G.R, SNIDER T.G., THOMPSON B.A.
Measurement of ovarian development in red drum (*Sciaenops ocellatus*) from offshore stocks. *Contributions in Marine Science*, 1988, **suppl. To vol. 30**, 79-86.

FRERICHS G.N., RODGER H.D., PERIC Z.
Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of general virology*, 1996, **77**, 2067-2071.

GARDES L.
L'induction hormonale de la ponte chez *Sciaenops ocellatus*. Détermination des conditions optimales de réussite.
Mémoire de fin d'études : Rennes, Ecole Nationale Supérieure Agronomique : 1998, 75 p.

GAUTHIER E., DAO J.C.
Analyse de la filière de production aquacole de l'ombrine en Martinique.
Rapport interne de la direction des ressources vivantes de l'IFREMER, 2003, RA Martinique, 129 p.

GLAZEBROOK J.S., HEASMAN M.P., DE BEER S.W.
Picorna-like virus particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of fish diseases*, 1990, **13**, 3, 245-249.

GOYARD E., FALGUIERE J.C., SOLETSCHNIK P.
L'élevage de l'ombrine (*Sciaenops ocellata*) en Martinique: I – Maturation des géniteurs et production d'alevins. *Rapport interne de la direction des ressources vivantes de l'IFREMER*, 1993, n° 93017-RA Martinique, 73 p.

GROTMOL S., TOTLAND G.K., THORUD K., HJELTNES B.K.
Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent : a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*.
Diseases of aquatic organisms, 1997, **29**, 85-97.

DE KINKELIN P., MICHEL C., GHITTINO P.
Précis de pathologie des poissons. PARIS : INRA-OIE, 1985.

HEGDE A., TEH H.C., LAM T.J., SIN Y.M.
Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poicelia reticulata* – comparative characterization and pathogenicity studies.
Archives of virology, 2003, **148**, 575-586.

HONG W., ZHANG Q.
Review of captive bred species and fry production of marine fish in China. *Aquaculture*, 2003, **227**, 305-318.

HOUEL S., FALGUIERE J.C., PAQUOTTE P.

Analyse technico-économique de projets d'élevage d'ombrine (*Sciaenops ocellata*) en cages flottantes à la Martinique.

Rapport interne de la direction des ressources vivantes de l'IFREMER, 1996, n° 96-12.

HUANG B., TAN C., CHANG S., MUNDAY B., MATHEW J., NGOH G., KWANG J.

Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer*, using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR.

Journal of fish diseases, 2001, **24**, 135-141.

JOHANSEN R., AMUNDSEN M., DANNEVIG B.H., SOMMER A.I.

Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhicas minor*. *Diseases of aquatic organisms*, 2003, **57**, 35-41.

LE BRETON A., GRISEZ L., SWEETMAN J., OLLEVIER F.

Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of fish diseases*, 1997, **20**, 145-151.

MATLOCK G.C.

The life history of red drum. Proceedings of a symposium on the culture of red drum and other warm water fishes. Corpus Christi, Texas , 1987

Texas : Red drum aquaculture, 1990, 236 p.

MORI K.I., NAKAI T., MUROGA K., ARIMOTO M., MUSHIAKE K., FURASAWA I.

Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval Striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 1992, **187**, 368-371.

MORI K., MANGYOKU T., IWAMOTO T., ARIMOTO M., TANAKA S., NAKAI T.

Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Diseases of aquatic organisms*, 2003, **57**, 19-26.

MUNDAY B. L., KWANG J., MOODY N.

Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of fish diseases*, 2002, **25**, 127-142.

MURPHY M.D., TAYLOR R.G.

Reproduction, growth and mortality of red drum *Sciaenops ocellatus* in Florida waters. *Fishery Bulletin*, 1990, **88**, 531-542.

MUSHIAKE K., ARIMOTO M., FURUSAWA T., FURUSAWA I., NAKAI T., MUROGA K.

Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon suisan gakkaiishi*, 1992, **58**, 12, 2351-2356.

MUSHIAKE K., NISHIZAWA T., NAKAI T.

Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNN gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish pathology*, 1994, **29**, 3, 177-182.

NEILL W.H.

Environmental requirements of Red drum. Proceedings of a symposium on the culture of red drum and other warm water fishes. Corpus Christi, Texas , 1987. Texas : Red drum aquaculture, 1990, 236 p.

NGUYEN H.D., MUSHIAKE K., NAKAI T., MUROGA K.

Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Diseases of aquatic organisms*, 1997, **28**, 87-91.

NISHIZAWA T., FURUHASHI M., NAGAI T., NAKAI T., MUROGA K.

Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and environmental microbiology*, 1997, **63**, 4, 1633-1636.

NITZAN S., SHWARTSBERG B., HELLER E.D.

The effect of storing hybrid bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*) sera at freezing temperatures on antibody titers. *Fish and shellfish immunology*, 2003, **15**, 341-347.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE)

Viral encephalopathy and retinopathy.

In : OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE)

Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Paris : OIE fish disease commission, 1995, 85-90.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE)

Viral encephalopathy and retinopathy.

In : OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE)

Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Paris : OIE fish disease commission, 2000, 69-73.

OH M., JUNG S., KIM S., RAJENDRAN K., KIM Y., CHOI T., KIM H., KIM J.

A fish nodavirus associated with mass mortalities in hatchery-reared red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 2002, **211**, 1-7.

OVERSTREET R.M.

Aspect of the biology of the red drum, *Sciaenops ocellatus*, in Mississippi. *Gulf Research Reports Supplement* 1, 1983, 45-68.

PEDUCASSE S., CASTRIC J., THIERY R., JEFFROY J., LE VEN A., BAUDIN F.

Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways.

Diseases of aquatic organisms, 1999, **36**, 11-20.

PEDUCASSE S.

Caractérisation du nodavirus, pathogénie et épidémiologie expérimentale de la nodaviriose ou de l'encéphalopathie et rétinopathie virales chez le bar juvénile *Dicentrarchus labrax* (L.).

Th. : Parasitologie : Montpellier, Université Montpellier II : 2000. 181 p.

RENAULT T., HAFFNER P., BAUDIN LAURENCIN F., BREUIL G., BONAMI J.R.
Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bulletin of the european association of fish pathologists*, 1991, **11**, 2, 68-73.

SKLIRIS G.P., RICHARDS R.H.
Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture*, 1998, **169**, 133-141.

SKLIRIS G.P., RICHARDS R.H.
Nodavirus isolated from experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of fish diseases*, 1999, **22**, 315-318.

SOMMERSET I., NERLAND A.
Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Diseases of aquatic organisms*, 2004, **58**, 117-125.

SOMMERSET I., SKERN R., BIERING E., BLEIE H., FIKSDAL I., GROVE S., NERLAND A.
Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish and shellfish immunology*, 2005, **18**, 13-29.

STARKEY W.G., IRELAND J.H., MUIR K.F., SHINN A.P., RICHARDS R.H., FERGUSON H.W.
Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal of fish diseases*, 2000, **23**, 419-422.

TANAKA S., AOKI H., NAKAI T.
Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology*, 1998, **33**, 1, 31-36.

TANAKA S., MORI K., ARIMOTO M., NAKAI T.
Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of fish diseases*, 2001, **24**, 15-22.

THIERY R., RAYMOND J.C., CASTRIC J.
Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus research*, 1999, **63**, 11-17.

TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J.J., SHAW A., MOUTOU F., LOUZA A.
Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 2^e édition. PARIS : AEEMA, 2001. 696 p.

UCKO M., COLORNI A., DIAMANT A.
Nodavirus infections in Israeli mariculture. *Journal of fish diseases*, 2004, **27**, 459-469.

WATANABE K., NISHIZAWA T., YOSHIMIZU M.

Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Diseases of aquatic organisms*, 2000, **41**, 219-223.

YUASA K., KOESHARARYANI I., ROZA D., MORI K., KATATA M., NAKAI T.

Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of betanodavirus.

Journal of fish diseases, 2002, **25**, 53-56.

ZUNPANC G., HORSCHKE I.

Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish : a quantitative mapping study.

Journal of comparative neurology, 1995, **353**, 2, 213-233.

Annexe 1 :

Tableau récapitulatif des espèces sensibles au nodavirus

Nom commun français	Nom commun anglais	Nom scientifique	Pays
Famille anguillidae anguille	European eel	<i>Anguilla anguilla</i>	Taiwan
Famille gadidae morue	atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>	United kindom, Canada
Famille centropomatidae brochet de mer	barramundi japanese sea bass	<i>Lates calcarifer</i> <i>Lateolabrax japonicus</i>	Australie, Chine, Indonésie, Israel, Malaisie, Philippines, Singapour, Tahiti, Taiwan, Thaïlande japon
Famille percichthyidae bar	european sea bass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Martinique, France, Grèce, Italie, Malte, Portugal, Espagne
Famille serranidae mérrou rouge tacheté mérrou jaune mérrou longues dents mérrou bagnard grand gueule mérrou noir loche mouchetée grisette	redspotted grouper yellow grouper black spotted grouper kelp grouper sevenband grouper brownspotted grouper dusky grouper greasy grouper humpback grouper	<i>Epinephelus akaara</i> <i>E. awoaora</i> <i>E. fuscogulatus</i> <i>E. moara</i> <i>E. septemfasciatus</i> <i>E. malabaricus</i> <i>E. marginatus</i> <i>E. tauvina</i> <i>Cromileptes altivelis</i>	Japon, Taiwan Taiwan Taiwan Japon Japon , Corée Thaïlande Méditerranée Malaisie, Philippines, Singapour Indonésie
Famille latridae	striped trumpeter	<i>Latris lineata</i>	Australie
Famille carangidae carengue dentue poisson limon carangue à plumes	striped jack purplish amberjack pompano	<i>Pseudocaranx dentex</i> <i>Periola dumerili</i> <i>Trachinotus blochii</i>	Japon Japon Taiwan
Famille sciaenide ombrine tambour rouge acoupa blanc	shi drum red drum white sea bass	<i>Umbrina cirrosa</i> <i>Sciaenops ocellatus.</i> <i>Atactoscion nobilis</i>	France et Italie Corée Etats-Unis
Famille oplegnathidae	japanese parrot fish rock porgy	<i>Oplegnathus fasciatus</i> <i>Oplegnathus punctatus</i>	Japon Japon
Famille eleotridae	sleepy cod	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	Australie
Famille rachycentridae cobia	cobia	<i>Rachycentron canadum</i>	Taiwan
Famille mugilidae muge	flatehead mullet	<i>Mugil cephalus</i>	Israel

Nom commun français	Nom commun anglais	Nom scientifique	Pays
Famille pleuronectidae			
flétan	barfin flounder halibut	<i>Verasper moseri</i> <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Japon Norvège et Ecosse
Famille bothidae			
cardeau hirame turbot	japanese flounder turbot	<i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Scophthalmus maximus</i>	Japon Norvege
Famille soleidae			
sole commune	dover sole	<i>Solea solea</i>	Royaume uni
Famille triodontidae			
	tiger puffer	<i>Takifugu rubripes</i>	Japon